



UNIVERSITÀ DI PISA

FACOLTÀ DI SCIENZE MATEMATICHE, FISICHE E NATURALI

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN
BIOTECNOLOGIE MOLECOLARI E INDUSTRIALI

Tesi di Laurea

**Tossicità acuta e bio-accumulo di metalli pesanti
in protisti ciliati dulcacquicoli del genere *Euplotes***

Relatore

Prof. Graziano Di Giuseppe

Candidato

Céline Fusi

Anno Accademico 2013/2014

Tossicità acuta e bio-accumulo di metalli pesanti in protisti ciliati dulcacquicoli del genere *Euplotes*

Sommario

RIASSUNTO	5
ABSTRACT	6
CAPITOLO 1 - INTRODUZIONE	7
Metalli pesanti	8
Cadmio	10
Cromo	11
Rame	12
Tallio	12
Metodi di rimozione di metalli pesanti	14
Protozoi ciliati e metalli pesanti	24
Ciliati del genere <i>Euplotes</i> e metalli pesanti	25
SCOPO DELLA TESI	30
CAPITOLO 2 - MATERIALI E METODI	31
Scelta delle specie e dei ceppi	33
Condizioni di coltura	35
Scelta dei metalli pesanti	37
Saggio del terreno di coltura e delle soluzioni di metalli pesanti	38
Curve di crescita	39
Conta delle cellule	39
Selezione delle concentrazioni di metalli pesanti	40
Valutazione della tossicità acuta	42
Saggio di bio-accumulo	45
CAPITOLO 3 - RISULTATI	47
Curve di crescita	48
Metallo pesante: Cu ²⁺	51
Saggio del terreno di coltura S.M.C.	51
Selezione delle concentrazioni di metallo pesante	52
Valutazione della tossicità acuta	55
Saggio di bio-accumulo	63
Metallo pesante: Cr ⁶⁺	64
Saggio del terreno di coltura S.M.C.	64
Selezione delle concentrazioni di metallo pesante	65
Valutazione della tossicità acuta	68
Saggio di bio-accumulo	76
Metallo pesante: Cd ²⁺	77
Saggio del terreno di coltura S.M.C.	77
Selezione delle concentrazioni di metallo pesante	78
Valutazione della tossicità acuta	81
Saggio di bio-accumulo	89
Metallo pesante: Tl ⁺	90
Risultati preliminari	90
Sintesi dei risultati ottenuti	91
CAPITOLO 4 - DISCUSSIONE	93
Accrescimento di protisti ciliati	94
Risposte eco-tossicologiche di protisti ciliati al Cu, Cr e Cd	95
Bio-accumulo di Cu, Cr e Cd in protisti ciliati	99

CAPITOLO 5 - CONCLUSIONI	102
BIBLIOGRAFIA	105
RINGRAZIAMENTI	122

Riassunto

I metalli pesanti vengono sfruttati dall'uomo da secoli, trovando numerose applicazioni in più campi: nell'industria metallurgica, nel settore conciario, nei dispositivi elettronici e altro ancora. Alcuni di essi sono essenziali per il metabolismo dell'uomo, mentre altri, come il cromo esavalente (Cr^{6+}) ed il cadmio (Cd^{2+}) possono avere effetti molto tossici. L'ambiente ha una certa capacità auto-depurativa nei confronti dei metalli pesanti. Tuttavia, quando la soglia viene superata ne consegue un impatto ambientale. L'accumulo di metalli pesanti nell'ambiente può essere provocato sia dalle attività antropiche, come quelle industriali e minerarie, sia da fenomeni naturali, quali eruzioni vulcaniche ed incendi boschivi.

Il metodo attuale di abbattimento dei metalli pesanti di tipo chimico-fisico è svolto da tre reattori in continuo, nei quali vengono utilizzati vari composti chimici. Durante il trattamento, i metalli pesanti precipitano in quello che viene definito fango, il quale, a sua volta, è sottoposto a disidratazione e stoccaggio in discarica. Questo metodo ha elevati costi e in molti hanno proposto come alternativa la “*bioremediation*”: ci sono degli organismi, come le piante, che accumulano naturalmente i metalli pesanti al proprio interno. Anche tra i microrganismi è stata osservata tale capacità di bio-accumulo. In particolare, studi condotti su protozoi ciliati del genere *Euplotes* hanno mostrato quanto alcune specie possano essere particolarmente resistenti ai metalli pesanti, oltre ad essere in grado di accumularli in modo attivo al proprio interno, in specifici vacuoli.

Sulla base dei lavori condotti e pubblicati in letteratura, questo studio si prefigge come obiettivo quello di indagare se vi siano tra le specie dulcacquicole del genere *Euplotes*, in collezione presso il laboratorio di Protistologia in cui ho svolto il mio lavoro di tesi, uno o più candidati applicabili nella “*bioremediation*” di metalli pesanti.

Per prima cosa, sono state selezionate le specie e le colture monoclonali (ceppi) da analizzare, in base agli studi presenti in letteratura ed alla provenienza dei singoli ceppi. Le specie ed i relativi ceppi (tra parentesi) selezionati sono i seguenti: *E. aediculatus* (2IP10rk1-2, RoM8, SPZ1), *E. octocarinatus* [27(11)-III, VTN7] e *E. harpa* (CIN4). Sulla base degli studi condotti in letteratura sono stati selezionati tre metalli pesanti: il cadmio (Cd^{2+}), il cromo esavalente (Cr^{6+}) ed il rame (Cu^{2+}). I ceppi selezionati sono stati mantenuti in coltura a circa 23 °C e sono stati cibati con la micro-alga *Chlorogonium* sp. Sulla base degli studi analoghi presenti in letteratura, sono stati messi a punto i protocolli per la misurazione della tossicità acuta e del bio-accumulo. La tossicità acuta è stata valutata calcolando il parametro LC_{50} , in 24 ore. Ogni esperimento è stato svolto in triplicato. Per ogni metallo pesante, sono state somministrate cinque diverse concentrazioni ed è stata calcolata la percentuale di sopravvivenza. Il bio-accumulo è stato valutato prendendo in considerazione, per ciascun metallo, il ceppo più resistente, cioè quello che mostrava il maggiore valore di LC_{50} , così come determinato nella valutazione della tossicità acuta. Nella valutazione del bio-accumulo, inoltre, la concentrazione utilizzata era pari alla LC_{50} calcolata e la quantità del metallo in analisi accumulato all'interno delle cellule è stata misurata con uno spettrometro al plasma.

I risultati ottenuti dalla valutazione della tossicità acuta hanno permesso di definire l'ordine di resistenza delle specie e dei ceppi analizzati e l'ordine di tossicità dei metalli pesanti testati. Viene esposta e discussa la comparazione dei risultati ottenuti sulla tossicità acuta e sul bio-accumulo di metalli pesanti nei ciliati con i dati già pubblicati.

Abstract

Heavy metals are largely employed in many anthropogenic activities, as metallurgy and tannery, they can also be used in electronic disposals and other technologies. Some of them are essential nutrients for human metabolism, others are very toxic, as hexavalent chromium (Cr^{6+}) and cadmium (Cd^{2+}). The environment has a natural auto-depurative capacity towards heavy metals. However, when the metals concentrations exceed the limit, they can damage the environment. Both anthropogenic activities, as mining and industries, both natural events, as volcanic eruption and forest fires can disperse heavy metals in the environment.

Nowadays, physics and chemical treatments are used to remove heavy metals from wastewater, with three continuous reactors, where many chemicals are employed. After this treatment, heavy metals precipitate as a sludge. The sludge is dehydrated and stored in discharge. Those treatments are expensive and many researchers proposed as alternative the bioremediation: many organisms, like plants, naturally accumulate heavy metals. Microorganisms too can bio-accumulate such contaminants. Some species of the ciliate protozoa genus *Euplotes* are very tolerant toward heavy metals and can actively accumulate them in specific vacuoles.

The objective of this investigation was to determine if there were good candidates for a heavy metal bioremediation among the freshwater species of *Euplotes* cultivated in the Protistology laboratory where I worked for this thesis.

First of all, considering the papers in literature and the geographic provenance, I select some species and monoclonal cultures (strains). The species and the strains (in parenthesis) selected are: *E. aediculatus* (2IP10rk1-2, RoM8, SPZ1), *E. octocarinatus* [27(11)-III, VTN7] and *E. harpa* (CIN4). Considering the data present in literature, three heavy metals were selected: cadmium (Cd^{2+}), hexavalent chromium (Cr^{6+}) and copper (Cu^{2+}). The selected ciliate strains cultures were maintained at 23 °C and cultured in S.M.C. medium, with *Chlorogonium* sp. as food. Considering papers in literature, protocols to evaluate acute toxicity and bio-accumulation were developed. The acute toxicity were evaluated for 24 h and the LC_{50} values were calculated. Three replicates for each experiment were run. For each species, a different set of five metal concentration was used and the mortality was checked after 24 h incubation. The strains more tolerant toward heavy metals were selected to run the bio-accumulation experiments. Concentrations used in the bio-accumulation test were the 24-h LC_{50} values. Bio-accumulation in the ciliates was measured using an ICP-MS spectrometer.

The results obtained from the evaluation of acute toxicity enabled to define the order of resistance of species and strains analyzed and to define the order of toxicity of heavy metals tested.

Results in acute toxicity and in bio-accumulation of heavy metals in ciliates were illustrated and compared with the literature's one.

1. Introduzione

1.1. Metalli pesanti

Il termine metallo pesante si riferisce a tutti gli elementi chimici che hanno le seguenti proprietà:

- densità $> 5 \text{ g/cm}^3$
- peso atomico > 20
- comportamento simile ai cationi
- bassa solubilità delle forme idrate
- tendenza a formare complessi
- forte affinità verso i solfuri
- stato di ossidazione variabile a seconda del pH e del potenziale di riduzione (Eh)

Vi sono degli elementi che vengono considerati metalli pesanti nonostante non abbiano una densità superiore ai 5 g/cm^3 , come l'arsenico (As), il molibdeno (Mo) ed il selenio (Se).

I metalli pesanti sono una naturale componente di tutti gli ambienti: crosta terrestre, acque e aria, dove sono presenti in diverse concentrazioni. Nella crosta terrestre i metalli pesanti possono raggiungere alte concentrazioni, nelle acque solitamente i loro livelli sono molto bassi, a seconda del metallo in questione. Secondo i dati riportati dall'Istituto di Ricerca sulle Acque del CNR, il cadmio (Cd) è concentrato circa $0,01 \text{ } \mu\text{g/L}$ nelle acque dolci e marine non contaminate, mentre nella crosta terrestre varia tra $0,1$ e $0,5 \text{ mg/kg}$; il cromo (Cr) è concentrato circa $0,2 \text{ } \mu\text{g/L}$ nelle acque dolci e marine non contaminate e circa 100 mg/kg nella crosta terrestre; il rame (Cu) invece è concentrato nella crosta terrestre tra $23,6$ e 47 mg/kg ; nelle acque dolci non contaminate i suoi valori rimangono inferiori a $1 \text{ } \mu\text{g/L}$, mentre in quelle marine inferiori a $0,3 \text{ } \mu\text{g/L}$ (Istituto di Ricerca sulle Acque, CNR). La dispersione dei metalli pesanti nell'atmosfera e nell'acqua con eventuale inquinamento può essere favorita tanto da fenomeni naturali quanto dalle attività antropiche. Tra gli eventi naturali si annoverano gli incendi boschivi e le eruzioni vulcaniche, anche oceaniche. Le attività dell'uomo che provocano l'inquinamento da metalli pesanti sono suddivisibili in tre categorie: industria (metallurgica, mineraria, chimica, elettrochimica), agricoltura (fertilizzanti, pesticidi) e urbana (rifiuti, riscaldamento, trasporti). L'inquinamento da metalli pesanti può colpire anche l'economia, a causa dell'impatto sulla salute dell'uomo e sull'agricoltura e l'allevamento.

Alcuni metalli pesanti sono importanti per il metabolismo degli esseri viventi e vengono definiti "essenziali": il calcio (Ca), il cobalto (Co), il cromo trivalente (Cr^{3+}), il ferro (Fe), il magnesio (Mg), il manganese (Mn), il nichel (Ni) e lo zinco (Zn). I metalli pesanti possono stabilizzare le proteine strutturali, essere coinvolti nella catalisi enzimatica ed aiutare a mantenere l'equilibrio osmotico (Duruibe *et al.*, 2007). Sia una loro carenza che un loro eccesso provocano danni all'organismo. Altri metalli pesanti invece non hanno funzioni biologiche e difatti sono tossici per gli esseri viventi: l'alluminio (Al), l'argento (Ag), Cd, Cr^{6+} , il mercurio (Hg), l'oro (Au), il piombo (Pb) ed il tallio (Tl) (Hughes e Poole, 1989; Poole e Gadd, 1989; Ji e Silver, 1995; Lovley, 2000).

La tossicità dei metalli pesanti si esplica in vari modi: interferendo con la fosforilazione, sostituendosi ai metalli essenziali e legando i gruppi tiolici delle proteine, alterandone la struttura (Järup, 2003; Duruibe *et al.*, 2007). I metalli pesanti possono anche modificare la struttura degli acidi nucleici, danneggiando il DNA (Poole e Gadd, 1989). Di conseguenza, essi possono provocare tumori, danni a reni e a fegato; a seconda della via di contatto, i

metalli pesanti possono causare irritazione cutanea, vomito e diarrea, disturbi respiratori (Järup, 2003; Duruibe *et al.*, 2007). I metalli pesanti vengono eliminati dall'uomo tramite la minzione e la sudorazione, tuttavia la loro emivita può essere molto lunga. Essi tendono ad accumularsi negli organi e nelle ossa.

La disponibilità dei metalli pesanti può essere influenzata da più fattori: il pH, la presenza di ioni e di altre sostanze (Gadd e Griffiths, 1978).

Il pH può influenzare notevolmente la disponibilità e la tossicità dei metalli pesanti. A pH acidi di solito essi sono in forma di cationi, mentre a pH alcalini precipitano in forma di idrossidi o di ossidi insolubili (Gadd e Griffiths, 1978). Ad esempio, il rame concentrato circa 1 mg/L precipita a $\text{pH} < 6$ ed a $E_h < +200 \text{ mV}$, mentre a $\text{pH} > 6$ precipita, indipendentemente dal valore di E_h (Ehrlich, 1963). Alcuni metalli come il rame hanno più stati di ossidazione. Solitamente gli stati ossidati sono meno solubili rispetto a quelli ridotti e precipitano a pH bassi (Buckman e Brady, 1969).

Un esempio estremo è il caso dei drenaggi acidi di miniera, dove il pH può scendere sotto a 2. I drenaggi acidi si formano quando i minerali contenenti solfuri (ad es. pirite, FeS_2) entrano in contatto con aria e acqua: i solfuri si ossidano spontaneamente, con riduzione del ferro e abbassamento del pH. Con il tempo il minerale subisce una dissoluzione, l'acqua che scorre attraverso le miniere diventa acida ed i metalli vengono rilasciati in soluzione (Johnson e Hallberg, 2003). Intorno alla miniera si possono formare aree dove le acque sono acide e ricche in metalli e ioni solfati, con conseguente inquinamento dell'ambiente (Johnson e Hallberg, 2003). Nonostante le condizioni estreme (pH acido e presenza di metalli pesanti) qui si sviluppano diversi microrganismi: batteri, micro-alghe, funghi unicellulari e protozoi (Bennet, 1969; Ehrlich, 1963; Griffiths *et al.*, 1975; Whitton e Say, 1975). I casi di drenaggi acidi più famosi sono stati documentati negli Stati Uniti, tuttavia ce ne sono anche in Italia, ad esempio in Sardegna ed in Toscana (presso la miniera dismessa di Sant'Anna di Stazzema, Lucca).

La presenza di altri ioni può interferire con l'attività e con la tossicità dei metalli pesanti. Sono stati condotti studi in merito sui microrganismi: se ne riporta qualche esempio.

In presenza di Mg e di Ca viene ridotta la tossicità di Ni, Co, Cd, Zn e Mn nei confronti di *E. coli* (Abelson e Aldous, 1950). È stato dimostrato che in presenza di alte concentrazioni di Mg viene ridotta la disponibilità di Zn e di Cd nei confronti di *Aspergillus niger* (Laborey *et al.*, 1977). Fe è in grado di ridurre la tossicità di Cu nei confronti della micro-alga *Chlorella pyrenoidosa* (Steeemann Nielsen *et al.*, 1970), probabilmente perché viene adsorbito dalle micelle di idrossido di ferro, cariche negativamente. I fosfati, i tiosolfati, i carbonati e gli ioni bicarbonati possono precipitare con i metalli pesanti, a seconda della loro concentrazione e del pH. Al contrario, alcuni composti hanno un effetto sinergico, implementando la tossicità dei metalli pesanti. Ad esempio, il rame non è particolarmente tossico nei confronti di *C. vulgaris*; tuttavia, se questo viene somministrato in combinazione al fluoruro (F^-), la respirazione della micro-alga viene completamente inibita (Hassall, 1967). Nel terreno, i metalli pesanti possono legarsi a proteine, agli acidi fulvici e in particolare agli acidi umici. Questo legame può rendere abbassare la disponibilità dei metalli essenziali per il metabolismo delle piante (Ennis e Brogan, 1961; Benes *et al.*, 1976; Stevenson, 1976; Cole, 1977). Le particelle di argilla possono legare i cationi metallici (ad es. Zn), i quali non saranno più biodisponibili (Zajic, 1969; Holm e Cox, 1975). In altri casi può esserci una riduzione della tossicità; ad esempio, Cd può essere legato dalle particelle di argilla, le quali sono in grado di prevenire la sua azione tossica nei confronti di microrganismi e di funghi filamentosi (Babich e Stotzky, 1977a, b).

Negli habitat acquatici, alcuni metalli (ad es. Zn e Cu) possono essere legati dai

sedimenti organici, riducendo di fatto la loro concentrazione nelle acque (Bachmann, 1963; Whitton e Say, 1975). È stato documentato che in alcuni ambienti acquatici contaminati da olio la componente oleosa è in grado di legare i metalli presenti. Nel caso documentato, la concentrazione del mercurio nell'olio era 4.000 volte superiore rispetto ai sedimenti e 300.000 volte maggiore del campione di acqua. Alcuni microrganismi rinvenuti nell'interfaccia olio-acqua erano in grado di degradare l'olio ed erano resistenti a Hg (Walker e Colwell, 1974). Altri composti che possono chelare i metalli sono il citrato, le cisteine, il glutammato e l'EDTA (Zimmerman, 1966; MacLeod *et al.*, 1967; Pickett e Dean, 1976). In altri casi, i complessi che i metalli formavano risultavano essere maggiormente tossici (Albert, 1965). Nei sistemi a fanghi attivi, i metalli possono essere adsorbiti dalla materia organica, senza intaccare l'efficienza del sistema. È stato osservato che i protozoi (non identificati) presenti nei fanghi attivi non erano influenzati da concentrazioni di Cu fino a 5 mg/L e complessivamente l'efficienza del sistema veniva ridotta solo del 4% anche a concentrazioni di 25 mg/L (McDermott *et al.*, 1963).

Gli ioni metallici analizzati in questo studio sono il cadmio (Cd^{2+}), il cromo esavalente (Cr^{6+}) ed il rame (Cu^{2+}). Il rame è un metallo essenziale per il metabolismo, tuttavia un eccesso può dare effetti tossici. Cadmio e cromo, invece, sono metalli fortemente tossici per gli esseri viventi, d'altra parte trovano numerosi campi di applicazione e vengono ampiamente sfruttati. Ne consegue che molti rifiuti industriali possono contenere questi metalli pesanti e devono essere smaltiti nella maniera più corretta, per evitare danni a carico dell'ambiente e della salute dell'uomo.

Si illustrano qui di seguito le caratteristiche dei tre metalli in analisi, le fonti di inquinamento e gli effetti tossici.

1.1.1. Cadmio

Il cadmio è stato scoperto di recente, nel 1817 da Stromeyer, in Germania, ma solo a partire dalla prima guerra mondiale l'uomo ha cominciato a sfruttarlo. I fenomeni naturali che portano alla dispersione del cadmio sono le eruzioni vulcaniche ed il rilascio dai sedimenti; il primo è il maggior responsabile di emissioni nell'atmosfera. La dispersione in mare del cadmio è favorita anche dal vulcanismo oceanico (INCHEM, 1992). Le emissioni antropiche di cadmio sono varie: l'attività mineraria; la produzione di zinco, di rame e di piombo, di cui il cadmio è un sottoprodotto; la produzione di acciaio e di ferro; la combustione fossile; la lavorazione di materiali che contengono cadmio; i prodotti di scarto ed i rifiuti che lo contengono. Il cadmio è contenuto anche nelle foglie di tabacco, in quantità che di 3-36 ng per sigaretta, di cui solo una piccola parte viene aspirata se si usa il filtro. (INCHEM, 1992; Marchei *et al.*, 2003). A livello industriale, il cadmio viene impiegato nel rivestimento protettivo dell'acciaio, nei pigmenti di plastiche e di vetri, nei fertilizzanti; esso è utilizzato anche come stabilizzatore del PVC, come componente di varie leghe e soprattutto come elettrodo nelle batterie nichel-cadmio.

I sintomi di intossicazione da cadmio sono: se inalato, tosse, dispnea e febbre; se ingerito, vomito e diarrea. Il cadmio si accumula nel fegato e nei reni. Una minore quantità si può accumulare nelle ossa, nel cervello e nel grasso. Le patologie principali connesse al cadmio sono: glomerulopatia, tubulopatia, osteoporosi, anosmia e anemia per carenza di assorbimento del ferro. Il cadmio esplica la sua azione tossica in più modi: legando i gruppi sulfidrilici degli enzimi, bloccando la sintesi del gruppo eme e la respirazione cellulare, inibendo la sintesi proteica e la catalisi enzimatica (Duruibe *et al.*, 2007). Le metallotioneine prodotte da fegato e reni sembrano essere responsabili del trasporto e

della detossificazione del cadmio: queste proteine lo legano nel fegato e attraverso il sangue lo porterebbero ai reni, dove viene eliminato tramite la minzione (INCHEM, 1992).

1.1.2. Cromo

Il cromo è stato scoperto da Vauquelin, nel 1797 (Baruthio, 1992). Esistono molti stati di ossidazione del cromo ma in natura sono presenti prevalentemente le forme esavalente e trivalente (Palmer e Puls, 1996). In condizioni alcaline, fino anche a quelle leggermente acide, il cromo trivalente (Cr^{3+}) tende a precipitare in forma di idrossidi insolubili, immobilizzandosi nel terreno (Palmer e Puls, 1996). Il cromo esavalente (Cr^{6+}) è un forte ossidante e tende ad essere ridotto in presenza di un donatore di elettroni. In soluzione, il cromo esavalente è solitamente legato all'ossigeno, formando ioni monomerici bicromati (H_2CrO_4 , HCrO_4^-) e cromati (CrO_4^{2-}), aventi una colorazione gialla, oppure formando ioni dimerici dicromati ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$), di colore arancio.

Lo stato esavalente proviene soprattutto dalle attività antropiche. Anche se rari, esistono dei depositi di cromo esavalente, come la crocoite trovata nei Monti Urali. In natura, il cromo esavalente può essere ridotto dallo ione ferrico (Fe^{2+}) oppure, in presenza di materia organica, può spontaneamente ridursi alla forma trivalente (1), virando al blu. Oltre alla reazione di riduzione, il cromo esavalente può essere adsorbito dal terreno. Solo a concentrazioni elevate esso può permanere nel terreno (Bartlett e Kimble, 1976; Palmer e Puls, 1996; Dayan e Paine, 2001).



La differenza del potenziale elettrico tra Cr^{6+} e Cr^{3+} (1.33 v) è un indice del forte potenziale di ossidazione di Cr^{6+} e della quantità di energia necessaria a ossidare la forma trivalente (Dayan e Paine, 2001). L'ossidazione di Cr^{3+} a Cr^{6+} su scala industriale ebbe inizio dai primi anni dell'800. La combustione, l'attività industriale e i rifiuti domestici sono la principale fonte di emissioni di cromo nell'atmosfera e nelle acque di scarico. Per i motivi suddetti, una volta nelle acque reflue, Cr^{6+} tende ad essere ridotto alla forma trivalente. Le fonti naturali di emissioni di cromo sono: il vulcanismo, gli incendi boschivi ed il ciclo biologico.

Il cromo trivalente è un nutriente essenziale per l'organismo umano ed è coinvolto nel metabolismo dei carboidrati e dei lipidi (Vincent, 2013). La sua carenza può provocare diabete e disturbi cardiovascolari (Anderson, 1997). È stato dimostrato che Cr^{3+} è in grado di indurre delezioni al DNA, sia nel lievito (*Saccharomyces cerevisiae*) che nei topi (Kirpnick-Sobol *et al.*, 2006). Il cromo esavalente non è un metallo essenziale al metabolismo ed infatti è molto tossico. Esso è un agente mutageno, teratogenico e cancerogeno (Palmer e Puls, 1996; Kirpnick-Sobol *et al.*, 2006). I sintomi di una intossicazione da Cr^{6+} sono: se inalato, irritazione del tratto respiratorio, bronchiti e ulcerazione delle mucose; se a contatto con la pelle, dermatiti, *rush* cutanei e ulcere. Esposizioni prolungate possono provocare danni allo stomaco, al fegato e ai polmoni, alterazione del DNA, cancro ai polmoni e morte (Baruthio, 1992). Il cromo viene eliminato dall'uomo principalmente attraverso la respirazione, la sudorazione e in minima parte attraverso la minzione (Aitio *et al.*, 1984).

Il cromo viene utilizzato in metallurgia, ad esempio nella produzione del ferrocromo e di acciaio inossidabile. I cromati sono sfruttati per ossidare sostanze organiche, per purificare sostanze chimiche, nella produzione di pigmenti e nella placcatura (per le sue proprietà anticorrosive). Il solfato cromico viene impiegato nella concia del cuoio e la cromite viene utilizzata negli impasti per la cottura dei mattoni (Polak *et al.*, 1973).

1.1.3. Rame

Il rame è un elemento comune presente in tutti gli ambienti: nel terreno e nelle acque non contaminate, sia marine che dolci. La dispersione del rame è attuata da più veicoli naturali: eruzioni vulcaniche, vento, vapori di sale marino, incendi boschivi, decomposizione di organismi nei sedimenti acquatici e altri processi biologici (INCHEM, 1998).

Il rame è un materiale che trova numerose applicazioni per le sue caratteristiche: è duttile, malleabile ed è un buon conduttore elettrico e termico. Già dall'antichità è stato sfruttato: la sua scoperta ed il suo utilizzo segnano il passaggio dal Neolitico all'Eneolitico, ossia l'età del rame. Più tardi questo metallo venne utilizzato in combinazione con lo stagno, creando il bronzo. Questa lega ed il rame sono stati utilizzati per la creazione di utensili, di statue e di oggetti sacrali. Il rame viene utilizzato oggi per i cavi elettrici, per le tubature, per la costruzione di edifici e macchinari.

La fonte di inquinamento principale è l'attività mineraria, ma altre sorgenti sono le fonderie, gli inceneritori e l'agricoltura, dove il solfato di rame viene sfruttato nei fertilizzanti, nei fungicidi e negli algicidi (Fleming e Trevors, 1989; INCHEM, 1998). Il rame è un elemento essenziale per l'organismo umano: può avere il ruolo di cofattore di molti enzimi. È coinvolto nella catalisi di vari enzimi, nella respirazione cellulare, nella sintesi dell'emoglobina, nel metabolismo di acidi nucleici e di aminoacidi, nella difesa da radicali liberi, nella funzione dei neurotrasmettitori, nella regolazione dell'espressione genica, nella sintesi del tessuto connettivo e nel metabolismo del ferro (Uauy *et al.*, 1998). Sia una carenza che un eccesso di rame possono portare a varie disfunzioni. Una carenza può portare a danni al carico del tessuto connettivo, provocare anemia e nei bambini rallentare la crescita (Uauy *et al.*, 1998). Il rame può tuttavia catalizzare la formazione di radicali idrossilici molto reattivi; un suo eccesso può provocare l'anemia, irritare stomaco e intestino, danneggiare reni e fegato (INCHEM, 1998; Gaetke e Chow, 2003). Nei mammiferi, il modo principale per eliminare il rame in eccesso è tramite il fegato, il quale rilascia il metallo nelle secrezioni biliari. Altre vie di eliminazione secondarie sono la minzione e la sudorazione (INCHEM, 1998).

1.1.4. Tallio

Il tallio è un metallo pesante raro ma altamente tossico. In natura, la specie dominante è lo ione Tl^+ , il quale tende a formare composti inorganici stabili. Gli idrossidi, i carbonati ed i solfati del tallio sono molto solubili in acqua e questo ne facilita la dispersione (INCHEM, 1996; Peter e Viraraghavan, 2005). Nella crosta terrestre è concentrato circa 0,49 mg/L, mentre in quella oceanica scende a 0,013 mg/L. Le aree particolarmente ricche in tallio sono molto rare, in genere è più abbondante nei minerali quali: solfuro di zinco, solfuro di rame, solfuro di piombo e anche carbone (Peter e Viraraghavan, 2005). Ad alte temperature il tallio è volatile e la combustione di carbone, la fusione di metalli ferrosi e non ferrosi, la produzione di cemento e di mattoni possono provocare il rilascio in acque reflue e in atmosfera. Nelle acque di drenaggio di miniere sono stati misurati livelli di tallio compresi tra 1 e 88 mg/L. Soltanto di recente, a cominciare dalla Cina, si sono sviluppati sistemi di estrazione del tallio (INCHEM, 1996; Peter e Viraraghavan, 2005).

Il tallio è stato sfruttato per ridurre la sudorazione provocata dalla tubercolosi, per trattare la malaria, la sifilide e il tifo. È stato impiegato anche per provocare aborti illegalmente ed addirittura per commettere omicidi, poiché oltre ad essere letale, i sali del tallio sono incolori ed inodori. Dal 1920 è stato utilizzato come veleno per insetti e per roditori ma

oggi giorno molti Paesi proibiscono i veleni che lo contengono.

Attualmente il tallio trova svariate applicazioni: nei dispositivi elettronici, nelle componenti ottiche per la luce a infrarossi, come scintillatore, come semiconduttore, nei termometri per basse temperature (inferiori ai $- 59\text{ }^{\circ}\text{C}$), nella risonanza magnetica funzionale, nella propulsione magnetica e nello sviluppo di superconduttori (INCHEM, 1996; Peter e Viraraghavan , 2005).

Per i mammiferi il tallio è più tossico dei metalli Hg, Pb, Cd, Zn e Cu. Può essere assorbito dalla pelle e dalle mucose e si accumula nelle ossa, nei reni, talvolta anche nel sistema nervoso. Provoca la caduta di peli e capelli, danneggia i polmoni, il cuore, il sistema nervoso, il fegato, i reni e può alterare lo sviluppo nei bambini. Il tallio viene eliminato dal corpo tramite la minzione (INCHEM, 1996; Peter e Viraraghavan , 2005).

I vari meccanismi con cui il tallio esplica la sua attività tossica non è del tutto chiara. Viste le sue proprietà simili al potassio (K^+), si suppone che il tallio interferisca con i processi che lo coinvolgono, ad esempio con la pompa sodio-potassio, la piruvato chinasi e l'aldeide deidrogenasi. Il tallio può formare legami con i gruppi sulfidrilici delle proteine, può inibire la respirazione cellulare, interferire con l'omeostasi del calcio e con i meccanismi di trasporto, interagire con le riboflavine, ridurre la mitosi e influenzare la produzione di enzimi e la sintesi

aminoacidica (INCHEM, 1996; Peter e Viraraghavan , 2005).

1.2. Metodi di rimozione di metalli pesanti

La quantità massima di metalli pesanti consentita nelle acque superficiali e fognarie è regolamentata dal Decreto Legislativo n. 152 del 2006, come indicato in Tabella 1.

Tabella 1. Tabella 5 dell'Allegato 3 del D. Lgs. 152/06, riportante i valori limiti di emissione di metalli pesanti nelle acque.

Acque superficiali		Acque fognarie	
Metallo Pesante	Valore limite	Metallo Pesante	Valore limite
Cadmio	$\leq 0,02$ mg/L	Cadmio	$\leq 0,002$ mg/L
Cromo VI	$\leq 0,2$ mg/L	Cromo VI	$\leq 0,20$ mg/L
Rame	$\leq 0,1$ mg/L	Rame	$\leq 0,4$ mg/L

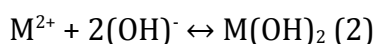
In Italia il tallio non è sottoposto a norma di legge, di conseguenza solitamente non ne viene accertata la presenza né viene quantificato. L'agenzia di protezione ambientale statunitense (US EPA) ha stabilito che il livello di tallio nelle acque reflue deve essere abbattuto fino a un minimo di 0,14 mg/L (Peter e Viraraghavan, 2005).

I metalli pesanti possono essere eliminati tramite svariati metodi chimici e/o fisici. I reflui industriali spesso contengono metalli pesanti, in particolare quelli dell'industria galvanica e metalmeccanica (Babel e Kurniawan, 2004). I depuratori devono rimuovere i contaminanti di modo che nelle acque trattate le loro concentrazioni siano sotto i valori soglia stabiliti dalla legge (D. Lgs. 152/2006). Si riportano in seguito i metodi chimico-fisici sviluppati negli anni per la rimozione dei metalli pesanti dalle acque reflue (Kurniawan *et al.*, 2006):

- precipitazione chimica
- coagulazione-flocculazione
- flottazione
- scambio ionico
- filtrazione tramite membrana
- trattamenti elettrochimici (elettrodialisi, elettrolisi a membrana, precipitazione elettrochimica)
- adsorbimento

Precipitazione chimica

Questo metodo viene ampiamente utilizzato per la rimozione dei metalli pesanti dagli effluenti inorganici (Benefield *et al.*, 1999; US Environmental Protection Agency, 2000). Il pH viene portato al valore di 11 e viene aggiunto un agente precipitante come il latte di calce [idrossido di calce, $\text{Ca}(\text{OH})_2$], di modo da far precipitare i metalli pesanti disciolti in forma di idrossidi, solitamente (2) (Tunay, 2003; Wang *et al.*, 2004).



Il pH è un parametro molto importante per la precipitazione dei metalli. Inoltre, il latte di calce è un agente precipitante poco costoso, non è nocivo ed è disponibile in molti Paesi e pertanto molto utilizzato. In alternativa al latte di calce, è possibile utilizzare l'idrossido di sodio. Con questo metodo, i metalli pesanti quali Zn^{2+} , Cd^{2+} e Mn^{2+} , alle concentrazioni iniziali di 450 mg/L, 150 mg/L e 1.085 mg/L, rispettivamente (Charerntanyarak, 1999), possono scendere sotto i 5 mg/L, ma non sotto i valori soglia definiti per legge (US Environmental Protection Agency, 1980): per questo motivo, tale metodo andrebbe utilizzato in combinazione ad altri metodi chimico-fisici. Gli effluenti inorganici da trattare possono contenere infatti concentrazioni di metalli pesanti maggiori di 1.000 mg/L (Kurniawan *et al.*, 2006) e per ridurre i livelli sotto i valori accettabili per legge potrebbe essere necessaria una grande quantità di reagenti (Jüttner *et al.*, 2000). Altri svantaggi del metodo sono la lenta precipitazione dei metalli e l'eccessiva quantità di fango prodotto, che deve essere trattato e smaltito, con conseguente incremento dei costi (Yang *et al.*, 2001; Bose *et al.*, 2002).

Coagulazione-flocculazione

Con questo metodo è possibile trattare effluenti inorganici carichi di metalli pesanti, con concentrazioni inferiori a 100 mg/L o superiori a 1.000 mg/L (Kurniawan *et al.*, 2006). Nel processo di coagulazione viene aggiunto un agente coagulante, come il cloruro ferrico ($FeCl_3$), il policloruro di alluminio (PAC) o il solfato ferroso ($FeSO_4$). L'agente coagulante destabilizza le particelle colloidali, che precipitano (Shammas *et al.*, 2004). I sali di ferro e di alluminio sono in grado di contrastare le forze repulsive tra le particelle. Se necessario, il pH può essere aggiustato con l'aggiunta di acido cloridrico (HCl) o di acido solforico (H_2SO_4).

A questo processo può seguire quello di flocculazione, in cui le particelle instabili si aggregano a formare dei grossi fiocchi. La flocculazione può essere ottenuta aggiungendo del polielettrolita, un polimero costituito da unità in grado di condurre la corrente (Semerjian *et al.*, 2003). Per una migliore efficacia, il pH dovrebbe aggirarsi intorno ad un valore di 11,0 - 11,5 (Kurniawan *et al.*, 2006). I vantaggi di questo metodo sono: stabilità del fango, capacità di inattivare i batteri e perdita di acqua (Cheng *et al.*, 1994; Edwards, 1994). Gli svantaggi sono: costi elevati a causa del rapido consumo di sostanze chimiche, grande volume del fango in uscita, che deve poi essere convertito in un prodotto stabile per evitare perdite di metalli pesanti (Ayoub *et al.*, 2001). Per superare questi problemi è possibile utilizzare come alternativa l'elettro-coagulazione: questo metodo consente di rimuovere particelle colloidali più piccole, con la produzione di un fango meno voluminoso (Vik *et al.*, 1984; Elimelech e O'Melia, 1990). Tuttavia, con questo metodo si possono formare dei fiocchi di idrossidi metallici, che devono essere purificati (Persin e Rumeau, 1989).

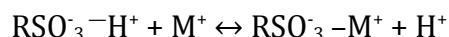
Flottazione

La flottazione è uno dei metodi più impiegati nel trattamento delle acque reflue contaminate da metalli pesanti (Zabel, 1984). Viene insufflata aria cosicché si formino delle bolle, alle quali si legano le particelle idrofile; le altre, tra cui i metalli pesanti, precipitano sul fondo. Le bolle salgono in superficie, portandosi dietro le particelle adese e formando una schiuma (Zabel, 1984). È stata valutata l'efficacia di vari reagenti per la flottazione dei metalli pesanti: cabasite, SDS e HDTMA (Rubio e Tessele, 1997; Zamboulis *et al.*, 2004). La flottazione può essere utilizzata in combinazione ad altri trattamenti, come quello chimico

fisico, quello a carboni attivi o la filtrazione (Offringa, 1995; Lainé *et al.*, 1998). La flottazione consente di trattare effluenti inorganici contenenti metalli pesanti concentrati 50 - 150 mg/L e oltre, a seconda dei reagenti impiegati. Ad esempio, la zeolite e la cabasite permettono di rimuovere più del 95% dei metalli pesanti concentrati 60 - 500 mg/L (Kurniawan *et al.*, 2006). I vantaggi di questo sistema sono: una buona rimozione delle particelle piccole, dei brevi tempi di ritenzione idraulica e un basso costo (Matis *et al.*, 2003; 2004).

Scambio ionico

Il sistema a scambio ionico è utilizzato di frequente per la rimozione dei metalli pesanti dalle acque reflue. Il principio base del sistema consiste nello scambio di ioni tra una fase solida ed una liquida: delle apposite resine catturano gli ioni da una soluzione elettrolitica e vi rilasciano altri ioni, di una carica equivalente a quelli rimossi. La struttura della resina rimane invariata (Rengaraj *et al.*, 2001; Vigneswaran *et al.*, 2004). Esistono tre tipi di resine: quelle cationiche (cariche positivamente), quelle anioniche (cariche negativamente) e quelle anfotere (composte da una parte anionica ed una cationica). Con questo sistema è possibile rimuovere i metalli pesanti dagli effluenti inorganici (Dabrowski *et al.*, 2004). Lo scambio ionico tra resina e metallo pesante è rappresentabile con questa formula, in cui i gruppi funzionali della resina sono acidi solfiti (Dabrowski *et al.*, 2004):



Una volta catturati dalla resina, i metalli devono essere eluiti con dei reagenti. Sono state analizzate varie resine per capire quale fosse quella più adatta alla rimozione dei metalli pesanti dalle acque reflue, ad esempio, quelle a base di zeolite e amberlite (Sapari *et al.*, 1996; Álvarez-Ayuso *et al.*, 2003). Il sistema a scambio ionico consente una rimozione di metalli pesanti concentrati inizialmente 10 - 100 mg/L, con un pH di 2 - 6 (Kurniawan *et al.*, 2006). Il sistema non ha costi elevati e le resine possono essere ideate con dei siti di legame specifici per i metalli, rendendo il metodo più rapido ed efficiente. Il sistema a scambio ionico può essere trasportato e sfruttato direttamente sul campo (Korngold *et al.*, 2003). D'altra parte, per una buona efficienza le acque reflue devono essere trattate preliminarmente, al fine di rimuovere particelle solide in sospensione. Un ulteriore svantaggio è che non sono disponibili resine per tutti i metalli pesanti.

Filtrazione tramite membrana

Questo metodo consente di rimuovere non solo la componente organica e le particelle in sospensione, ma anche i contaminanti inorganici come i metalli pesanti. Esistono più tipologie di filtrazioni, in cui membrane sono in grado di trattenere particelle di diverse dimensioni. I metodi che possono trattenere i metalli pesanti sono: l'ultrafiltrazione, la nanofiltrazione e l'osmosi inversa.

L'ultrafiltrazione sfrutta una membrana dai pori del diametro di 5 - 20 nm e può separare composti dal peso molecolare compreso tra 1.000 Da e 100 kDa. L'ultra filtrazione consente il passaggio di molecole piccole e di acqua, trattenendo le macromolecole (Sablani *et al.*, 2001). Esistono vari tipi di membrane e possono essere modificate per migliorarne l'efficacia. In particolare, sono stati condotti vari studi per mettere a punto delle membrane adatte a rimuovere i metalli pesanti dalle acque reflue. Generalmente, a seconda delle caratteristiche della membrana, con l'ultrafiltrazione viene rimosso il 90% dei metalli

pesanti, concentrati tra 10 e 112 mg/L, a pH di 5 - 9,5 ed a una pressione di 2 - 5 bar (Akita *et al.*, 1999; Juang e Shiau, 2000; Laine *et al.*, 2000; Aliane *et al.*, 2001; Kryvoruchko *et al.*, 2002; Yurlova *et al.*, 2002; Saffaj *et al.*, 2004). Un vantaggio di questo sistema è che occupa uno spazio ridotto; tuttavia, dopo un certo tempo la membrana si decompone, risultando poco adatta al trattamento di acque reflue e comportando una spesa maggiore di manutenzione (Choi *et al.*, 2005).

La nanofiltrazione utilizza un meccanismo di separazione che si basa su effetti sterici ed elettrici. La membrana ha pori piccoli e le viene applicata una carica elettrica, così da consentire il passaggio solo ai soluti di dimensioni inferiori ad un determinato diametro ed aventi una certa carica. I soluti neutri e aventi un diametro superiore a quello dei pori della membrana vengono esclusi e trattenuti dalla membrana. Questo metodo è in grado di trattare effluenti inorganici contenenti fino a 2.000 mg/L di metalli. A seconda del tipo di membrana, è possibile utilizzare variazioni di pH comprese tra 3 e 8 e di pressione tra 3 e 4 bar (Kurniawan *et al.*, 2006).

L'osmosi inversa è un processo in cui i soluti passano dalla soluzione meno concentrata a quella più concentrata, grazie alla pressione applicata, che supera quella osmotica. Sono stati progettati vari tipi di membrane per l'osmosi inversa, alcune con pori di diametri molto piccoli, fino a 10^{-4} μm (Bohdziewicz *et al.*, 1999). A seconda delle sue caratteristiche, l'osmosi inversa può essere utilizzata con variazioni di pH comprese tra 3 e 11 e di pressione tra 4,5 e 5 bar. A maggiori valori di pressione si ha una migliore rimozione dei metalli pesanti. L'osmosi inversa ha più vantaggi: può lavorare ad elevati flussi di acqua, può rimuovere grandi quantità di sali, resiste ad agenti biologici, ha una buona resistenza meccanica, è chimicamente stabile e può essere utilizzata ad alte temperature (Ujang e Anderson, 1996). D'altro canto, vi sono alcune limitazioni: la membrana con il tempo può decomporsi, il tasso di flusso può calare con il tempo ed il sistema consuma molta energia (Slater, 1983; Ning, 2002). Esistono dei sistemi che rallentano i processi di degradazione della membrana (Álvarez-Vazquez *et al.*, 2004).

Sono stati condotti degli studi per confrontare la nanofiltrazione e l'osmosi inversa: la prima è meno costosa e richiede una pressione inferiore (Mohammad *et al.*, 2004); ambo i sistemi hanno una simile efficienza nella rimozione di metalli quali Cu e Cd da acque reflue sintetiche: la nanofiltrazione può rimuovere il 90% di Cu ed il 97% di Cd, entrambi concentrati inizialmente 200 mg/L, mentre l'osmosi inversa arriva a valori di rimozione di 98% e 99%, rispettivamente per Cu e Cd (Qdais e Moussa, 2004). Dei tre sistemi di filtrazione, solitamente quello più efficiente nella rimozione di metalli pesanti da una soluzione inorganica è il sistema ad osmosi inversa (Kurniawan *et al.*, 2006).

Elettrodialisi

In questo sistema si sfrutta una membrana a scambio ionico, alla quale viene applicato un potenziale elettrico: le particelle ioniche in soluzione sono costrette a passarvi attraverso (Bruggen e Vandecasteele, 2002). La membrana può essere anionica e cationica; gli anioni migreranno verso l'anodo e i cationi verso il catodo, attraversando la membrana (Itoi *et al.*, 1980; Chen, 2004). Secondo alcuni studi, questo sistema non è adatto al trattamento di effluenti inorganici contenenti metalli pesanti concentrati almeno 1.000 mg/L. Inoltre, trattandosi di una membrana, il sistema necessita di una manutenzione periodica (Kurniawan *et al.*, 2006).

Elettrolisi a membrana

Il sistema prevede l'applicazione di un potenziale elettrico ad una membrana a scambio ionico. Ci sono due tipi di catodi: uno classico di metallo ed uno avente un'elevata superficie (Janssen e Koene, 2002). Quando si applica un potenziale elettrico, all'anodo avviene una reazione di ossidazione, mentre al catodo una di riduzione. Tramite la reazione di ossido-riduzione, gli ioni metallici in soluzione diventano insolubili (Chen *et al.*, 2004). Questo sistema consuma molta energia (Kongsricharoern e Polprasert, 1995; Kongsricharoern e Polprasert, 1996), ma può trattare le acque reflue derivanti dai processi di placcatura, contenenti quantitativi di metalli pesanti superiori a 2.000 mg/L (Kurniawan *et al.*, 2006).

Precipitazione elettrochimica

Questo metodo nasce come potenziamento della precipitazione chimica, attraverso l'applicazione di un potenziale elettrico. Con questo sistema è possibile rimuovere metalli pesanti da reflui inorganici con concentrazioni superiori a 2.000 mg/L (Kurniawan *et al.*, 2006). Il sistema può lavorare sia in condizioni acide che basiche (Subbaiah *et al.*, 2002).

Adsorbimento

In questo metodo, le sostanze da rimuovere passano dalla fase liquida alla superficie di un solido, dove vengono legate tramite reazioni chimiche e/o fisiche (Kurniawan e Babel, 2003). Come fase solida, può essere utilizzato, ad esempio, il carbone attivo, il quale è in grado di rimuovere da effluenti inorganici metalli quali Ni, Cr(VI), Cd, Cu e Zn (Shim *et al.*, 1996; Ouki *et al.*, 1997; Leyva-Ramos *et al.*, 1997; 2002; Monser e Adhoum, 2002). Un'alternativa più economica e valida al carbone attivo può essere rappresentata dai rifiuti agricoli (Marshall *et al.*, 1999; Ajmal *et al.*, 2000; Kobya, 2004).

Rimozione del tallio

Il tallio può essere rimosso dalle acque reflue tramite vari metodi. Lo scambio ionico è il metodo suggerito dalla US Environmental Protec Agency. La precipitazione chimica con correzione del pH a valori di 3-4 consente di abbattere fino a 0,002 mg/L di tallio. L'adsorbimento è un altro metodo ampiamente studiato per la messa a punto di un sistema di rimozione del tallio e sono stati proposti vari reagenti, tra cui il diossido di manganese, che consente una rimozione del metallo fino a 0,1 mg/L (Peter e Viraraghavan, 2005).

Le metodiche illustrate vengono riassunte nella Tabella 2, con le rispettive percentuali di rimozioni di metalli pesanti.

Tabella 2. Confronto tra le metodiche chimico-fisiche di rimozione di metalli pesanti.

Tipo di trattamento	Metallo/i	Concentrazione iniziale (mg/L)	pH ottimale	Efficienza di rimozione del metallo (%)	Riferimento
Precipitazione chimica	Mn	1085	11,0	99,30	Charerntanyarak, 1999
Coagulazione	Cu	20	10,10-11,50	99	Li <i>et al.</i> , 2003
Flottazione	Zn	50	7-9	100	Matis <i>et al.</i> , 2004
Scambio ionico	Cr(III), Cu, Zn, Cd, Ni	100	n.d.	100	Rengaraj <i>et al.</i> , 2001
Ultrafiltrazione	Cu	79	8,5-9,5	100	Juang e Shiau, 2000
Nanofiltrazione	Cd	200	4-11	99	Qdais e Moussa, 2004
Osmosi inversa	Cu, Ni	50	7-9	100	Martínez <i>et al.</i> , 2004
Elettrolisi a membrana	Cr(VI)	130	8,5	99,60	Martínez <i>et al.</i> , 2004
Adsorbimento	Tl	12,5	n.d.	0,1	Peter e Viraraghadan, 2005

n.d.: non determinato

Dagli studi che sono stati condotti si evince che il sistema a scambio ionico permette di rimuovere completamente molti metalli pesanti, a partire da concentrazioni iniziali di 100 mg/L. Il metodo della precipitazione chimica con la calce permette di trattare effluenti inorganici contenenti livelli di metalli pesanti superiori a 1.000 mg/L. Rispetto all'osmosi inversa, la flottazione ha la stessa efficienza di rimozione di metalli, a parità di concentrazione iniziale, ma costa di meno. In generale, i trattamenti chimico-fisici sono rapidi, flessibili per quanto riguarda i cambiamenti di temperatura, facili da controllare e da mantenere. Rispetto ai trattamenti biologici, essi richiedono meno spazio ed i costi di installazione sono inferiori. Tuttavia, con il tempo, i trattamenti chimico-fisici diventano più costosi, a causa dell'acquisto di sostanze chimiche e del mantenimento dell'impianto. Si porta ad esempio l'impianto di abbattimento di metalli pesanti del depuratore di Acque S.p.A. di Pontedera, che utilizza tre reattori disposti in continuo (il prodotto del primo viene trasferito direttamente al secondo e così via): nel primo reattore avviene una reazione di coagulazione, con utilizzo di FeCl_3 ; nel secondo avviene la precipitazione chimica, tramite

Ca(OH)₂; nel terzo si ha la flocculazione, con utilizzo di polielettrolita e solfuro di sodio (Na₂S). I costi ed i consumi dei reagenti chimici sono i seguenti:

- FeCl₃: 170 € a tonnellata, consumo di 5.120 L al mese (circa 7 tonnellate).
- Ca(OH)₂: 75 € a tonnellata, consumo di 3.000 m³ al mese (circa una tonnellata e mezzo).
- Polielettrolita: 2,5 €/Kg, consumo di 192 kg al mese.
- Na₂S: 1,6 €/kg, consumo di 3.200 L al mese (circa 160 kg).

In natura esistono meccanismi atti a ridurre la tossicità dei metalli pesanti presenti nell'ambiente. Alcuni si basano su processi chimico-fisici, ad esempio, nel terreno i metalli possono legare acidi umici e altri componenti, invece nei fiumi i metalli tendono a precipitare sul fondo, andando a far parte del sedimento del letto. Altri processi sono mediati dalla componente biologica: alcune piante e microrganismi possono accumulare i metalli pesanti al loro interno, detossificando l'ambiente circostante. Molti ricercatori hanno cercato di provare a sfruttare i meccanismi di resistenza biologica per rimuovere i metalli pesanti inquinanti. I vari metodi biologici di abbattimento finora studiati possono essere suddivisi in (Dhokpande e Kaware, 2013):

- Bio-assorbimento
- bio-accumulo da parte di microrganismi
- processi a fanghi attivi
- biofiltri
- digestione anaerobica
- stagni stabilizzatori

Bio-assorbimento

Il bio-assorbimento è un processo passivo, che non richiede una spesa di energia: i metalli possono legarsi in modo aspecifico alla superficie delle cellule, alle matrici extracellulari come i biofilm batterici; i fanghi biologici possono intrappolare i metalli, o semplicemente i metalli possono penetrare attraverso di essi. Legandosi alla componente extracellulare e ai biofilm, i metalli pesanti vengono catturati e non possono più entrare all'interno dei microrganismi.

Il meccanismo tramite legame aspecifico implica che i metalli pesanti possano andare a legare sia le cellule vive che morte (Griffiths *et al.*, 1975). Ad esempio, è stato riscontrato che i metalli quali Cu, Cd e Zn sono in grado di complessarsi all'acido poligalatturonico delle pareti batteriche (Jellinek e Sangal, 1972). Nel lievito, i metalli pesanti tendono a legarsi in modo reversibile ai gruppi carbossilici e ai polifosfati presenti sulla superficie delle cellule (Rolhstein e Hayes, 1956; Oura e Suomalainen, 1971). Nel fungo *Neocosmospora vasinfecta*, Zn si lega alla sua superficie tramite i gruppi carichi negativamente, in maniera reversibile, rapida e temperatura-indipendente (Paton e Budd, 1972). I batteri che producono biofilm possono essere protetti dai metalli pesanti, i quali legano la componente extracellulare. I batteri in grado di produrre biofilm sono comuni in ambienti acquatici, dove in caso di inquinamento da metalli pesanti possono avere un ruolo importante nella detossificazione (Friedman e Dugan, 1968). Un caso particolare è quello dei batteri che si sviluppano nei drenaggi acidi di miniera, in cui vi sono elevate quantità di metalli pesanti in soluzione (Beech e Sunner, 2004). Esistono anche microrganismi eucariotici in grado di produrre biofilm: negli stessi drenaggi acidi di miniera, *Euglena*

mutabilis produce un biofilm che è in grado di legare Fe e Al (Brake e Hasiotis, 2004); nei laghi acidi a causa dei suddetti drenaggi è stato riscontrato che il biofilm algale è in grado di ridurre la tossicità dei metalli (Phillips *et al.*, 1995).

È stato studiato l'assorbimento di metalli pesanti da parte delle micro-alghe, quali *Spirogyra* sp., *Nostoc commune*, *Chlorella vulgaris* (Mane *et al.*, 2011; Moustafa e Idris, 2003). Alcuni hanno proposto l'utilizzo di una biomassa algale nel trattamento delle acque reflue per promuovere la rimozione di metalli pesanti (Wang e Chen, 2009). Hai Suo e collaboratori (2004) hanno messo a punto un sistema in cui il fango biologico veniva immobilizzato in "beads" di Ca-alginato, le quali venivano poi impiegate per bio-assorbire metalli pesanti quali Cu, Zn e Cr. Questo metodo si è rivelato, tuttavia, meno efficace rispetto all'impiego del fango in forma libera, sia per quanto riguarda l'efficienza di rimozione dei metalli, sia per quanto riguarda la sensibilità alla temperatura. Infatti, l'assorbimento di metalli da parte dei fanghi in forma libera non era suscettibile alla temperatura, mentre quella operata dai fanghi immobilizzati nelle "beads" era sensibile a variazioni comprese tra 10 °C e 40 °C. Molti ricercatori hanno proposto di ottimizzare lo sfruttamento dei microrganismi utilizzando le tecniche di immobilizzazione. Le cellule vive e immobilizzate possono essere infatti maggiormente controllabili; inoltre, a seconda della tecnica impiegata può essere possibile riciclare alcuni materiali, diminuendo dunque i costi della metodica (Dhokpande e Kaware, 2013).

Bio-accumulo da parte di microrganismi

Il bio-accumulo è un processo in cui delle sostanze vengono trasportate all'interno dei microrganismi con spesa di energia, tramite reazioni metaboliche. Ad esempio, vi sono delle micro-alghe che accumulano metalli pesanti al loro interno: possono compartimentalizzarli in vacuoli, come accade con Cu in *Scenedesmus acutiformis* e *S. acuminis* (Ferstenberg *et al.*, 1975); in alternativa, possono operare reazioni metaboliche che modificano i metalli in modo da ridurre od eliminarne la tossicità (Reed e Gadd, 1989). Un esempio è la capacità da parte di alcuni ceppi di lievito di ossidare il tallio grazie all'attività mitocondriale, provocandone la precipitazione (MacLeod *et al.*, 1967; Lindegren, 1971). Un'altra modificazione molto comune è la metilazione. Molti microrganismi sono in grado di attuarla: batteri anaerobici e aerobici, lieviti e funghi unicellulari (Fleming e Alexander, 1972; Cox e Alexander, 1973; Vonk e Sijpesteijn, 1973; Ross, 1975). Sebbene molti metalli metilati diventino maggiormente tossici, essi si volatilizzano e quindi vengono rilasciati nell'atmosfera. Questo è il caso del mercurio (Rogers, 1975). Alcuni studi hanno dimostrato che il bio-assorbimento è più efficiente del bio-accumulo, perché più rapido e in grado di rimuovere maggiori concentrazioni di metalli pesanti (Dhokpande e Kaware, 2013). Altri studi hanno dimostrato che, al contrario, esistono microrganismi che una volta morti non accumulano più metalli pesanti (Martín-González *et al.*, 2006; Rehman *et al.*, 2008).

È stato studiato il bio-accumulo di metalli pesanti da parte di numerosi microrganismi, quali procarioti, micro-alghe, funghi unicellulari e protozoi ciliati. In alcuni studi è stato valutato l'effetto del pH e della temperatura sul bio-accumulo da parte di *Staphylococcus saprophyticus*: i migliori valori di bio-accumulo sono stati ottenuti a pH 2 e temperatura pari a 27 °C per lo ione Cr^{6+} e a pH 3,7 e temperatura di 27 °C per lo ione Cu^{2+} (Ilhan *et al.*, 2004). Alcuni dei microrganismi studiati erano stati isolati da acque reflue e da fanghi attivi. Tra i protozoi ciliati analizzati, vi sono specie appartenenti al genere *Euplotes*, alcune campionate da acque dolci non contaminate, altre isolate da reflui e da fanghi attivi (Madoni *et al.*, 1992; 1994; Salvado *et al.*, 1997; Martín-González *et al.*, 2006). Sono stati

sviluppati e sono attualmente in uso dei bioreattori che sfruttano l'attività metabolica di batteri chiamati SRB (*Sulfate Reducing Bacteria*) (Rose *et al.*, 1998; 2013). Gli SRB riducono il solfato a solfuro, il quale forma complessi con i metalli, provocandone la precipitazione. Questi batteri sono anche in grado di alcalinizzare l'ambiente, favorendo ulteriormente la precipitazione dei metalli in soluzione. I bioreattori con gli SRB sono stati sviluppati per il trattamento dei drenaggi acidi di miniera e per quello delle acque di falda inquinate. Ne è stato messo a punto anche uno che prevede l'utilizzo di una biomassa algale come fonte di carbonio organico per gli SRB (Molwantwa *et al.*, 2000).

Impianti a fanghi attivi

Il processo a fanghi attivi è utilizzato negli impianti di depurazione per la biodegradazione delle sostanze organiche presenti nel refluo da trattare. In questo sistema, i batteri degradano la componente organica, mentre i protozoi regolano la componente procariotica, cibandosene. Il ruolo dei protozoi è importante, infatti la qualità del fango si può desumere dalle specie presenti e dalle relative quantità. Quello che viene misurato è l'indice biotico del fango (SBI, *sludge biotic index*) e consiste nel monitorare quali e quante specie siano presenti nel fango. In particolare, si conteggiano i ciliati mobili, i ciliati sessili, i ciliati natanti ed i flagellati. Quando la comunità presenta numerose specie, in cui nessuna domina sull'altra, il fango è solitamente efficace. Al contrario, quando una o poche specie predomina sulle altre si ha un cattivo funzionamento del sistema. Inoltre, un buon fango stabile con alta efficienza depurativa è caratterizzato dalla predominanza delle specie di ciliati mobili e sessili e dalla quasi assenza di ciliati natanti. Questi ultimi sono tipici dei liquami da trattare ed sono presenti nelle prime fasi di formazione del fango, in quanto specie pioniere. Con il tempo, i ciliati natanti tendono a sparire, mentre in concomitanza si sviluppano i ciliati mobili di fondo e sessili, i quali si nutrono dei batteri dei fiocchi di fango (Madoni, 1994).

Sono stati condotti vari studi per far luce sulle potenzialità dei fanghi attivi nella rimozione di metalli pesanti. Hassani e collaboratori (2010) hanno sviluppato un reattore che fa uso di fanghi attivi fissati (FAS, *Fixed Activated Sludge*) e hanno misurato la rimozione del COD (*Chemical Oxygen Demand*) e la percentuale di rimozione di metalli pesanti, i quali erano stati somministrati a diverse concentrazioni. Con la somministrazione di 1 mg/L di ogni metallo, veniva rimosso l'84% di Cr^{6+} , il 75% di Pb^{2+} e l'80% di Ni^{2+} . Con la somministrazione di 5 mg/L, veniva rimosso il 90% di Cr^{6+} , l'84% di Pb^{2+} e l'87% di Ni^{2+} . Atkinson e collaboratori (1998) hanno notato che il bio-assorbimento dei metalli pesanti non è specifico e che vengono legati quelli maggiormente concentrati. Rossin e collaboratori (1982) hanno analizzato diversi metalli pesanti presenti in un impianto pilota a fanghi attivi e hanno notato che la rimozione dei metalli pesanti era migliore con un fango datato di 12 giorni. In condizioni stabili, l'efficienza di rimozione di metalli pesanti era simile somministrandone concentrazioni sia elevate che normali. Dai vari studi sembrerebbe che la rimozione di metalli pesanti dai fanghi attivi sia determinata non soltanto dall'attività biologica ma da tutto il sistema.

Biofiltri

Alcuni ricercatori hanno valutato la possibilità di rimuovere i metalli pesanti per biofiltrazione, ossia utilizzando dei filtri percolatori colonizzati da batteri. Srivastava e Majumder (2008) hanno messo appunto un sistema per filtrare il nichel e hanno analizzato la cinetica della sua rimozione e calcolato i parametri legati al processo. I filtri (o letti)

percolatori vengono comunemente utilizzati dai depuratori come sistemi di ossidazione biologica del fango. Dermou e collaboratori (2005) hanno introdotto una modificazione a questo sistema, per testare la rimozione biologica di Cr^{6+} dalle acque reflue industriali. Sono stati utilizzati i batteri naturalmente presenti nel refluo industriale, così da avere delle specie già adattate a questo tipo di ambiente. I microrganismi si sono sviluppati ed hanno promosso la riduzione di 530 g/m^3 al giorno di Cr^{6+} a Cr^{3+} , uno stato di ossidazione meno tossico.

Digestione anaerobica

Tyagi e collaboratori (1988) e Ito e collaboratori (2008) hanno studiato un modo per rimuovere i metalli pesanti dai fanghi della digestione anaerobica durante i processi di depurazione. Entrambi gli studi hanno messo in evidenza che l'aggiunta di sostanze chimiche, come il solfato ferrico ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$), provocava una diminuzione del pH, con la conseguente eluizione dei metalli pesanti. Ito e collaboratori (2008) hanno osservato che con l'aggiunta dello ione ferrico (Fe^{3+}), i metalli pesanti quali Cd, Zn e Cu venivano eluiti in maniera più efficace rispetto all'aggiunta di acido solforico (H_2SO_4).

Stagni stabilizzatori ("pond")

Polprasert e Champratheep (1989) hanno condotto delle indagini per valutare la rimozione di metalli pesanti da parte del sistema WSP (*Waste Stabilisation Pond*) e hanno dimostrato che quando abbinato al sistema definito "*attached growth*", esso permette una diminuzione delle concentrazioni di Cr e di Cd.

1.3. Protozoi ciliati e metalli pesanti

Lo studio della tossicità dei metalli pesanti nei confronti dei microrganismi e la valutazione dei loro meccanismi di resistenza è piuttosto recente. I protozoi ciliati sono microrganismi unicellulari eucariotici, cosmopoliti, presenti in ambienti acquatici di acqua dolce, salmastra e marina. I protozoi ciliati si nutrono di batteri e di altri microrganismi, favorendo il ciclo del carbonio e dell'azoto (Fenchel *et al.*, 1987; Finlay *et al.*, 2000). I protozoi ciliati si sviluppano anche negli habitat inquinati, come i fanghi attivi, dove ne determinano la qualità (Curds, 1982; Madoni *et al.*, 1994; Nicolau *et al.*, 2001). Sono stati condotti degli studi per valutare gli effetti tossici dei metalli pesanti sui protozoi dei fanghi attivi: sembrerebbe che le popolazioni microbiche ne siano affette negativamente, in maniera diversa a seconda delle specie in esame, del tipo di metallo e della relativa concentrazione (Madoni *et al.*, 1992; 1994; 1996; Nederlof e Van Riemsdijk, 1995; Nicolau *et al.*, 2001).

Le indagini circa l'effetto dei metalli sui protozoi ciliati sono relativamente pochi e si concentrano su *Tetrahymena* spp., un genere ampiamente studiato. Le diverse specie di protozoi ciliati hanno dimostrato di avere un'ampia varietà di risposta nei confronti di metalli pesanti: alcune sono sensibili, altre mostrano una maggiore resistenza, altre ancora possiedono caratteristiche intermedie. Nella maggior parte degli studi riportati in letteratura si è valutato l'effetto di un solo metallo pesante. Relativamente pochi sono, invece, gli studi in cui è stata testata una miscela di metalli pesanti (Yamagushi *et al.*, 1973; 1974; Iftode *et al.*, 1985; Nilsson *et al.*, 1989; Martín-González *et al.*, 2006). La valutazione della tossicità di più metalli combinati insieme può fornire utili indicazioni, in quanto può esserci un effetto sinergico o al contrario una diminuzione della sensibilità ad un determinato metallo (vedere capitolo 1.1.).

I meccanismi di resistenza ai metalli pesanti nei protozoi ciliati sono stati scarsamente studiati. Si suppone che la resistenza ai metalli pesanti sia determinata da due meccanismi, come in altri microrganismi eucariotici: il bio-assorbimento ed il bio-accumulo.

Il bio-assorbimento è un processo passivo, non mediato dal metabolismo, ma determinato dall'accumulo dei metalli a livello delle strutture cellulari (Darnall *et al.*, 1986; Beveridge *et al.*, 1997; Viera e Volesky, 2000). Il bio-accumulo è promosso da un meccanismo attivo (dunque con spesa di energia), mediato dal metabolismo, in particolare dalle metallotioneine, proteine ricche in cisteine in grado di legare i metalli (Hamer *et al.*, 1986; Kaegi *et al.*, 1991; Klassen *et al.*, 1999). Sono state identificate le metallotioneine di poche specie appartenenti al genere *Tetrahymena* (Niederlehner *et al.*, 1985; Piccinni *et al.*, 1990; 1994; 1996), di *Colpoda inflata*, di *Uronema nigrans* e di *Sterkiella (Oxytricha) nova* (Díaz *et al.*, 2001). Dagli studi di tossicità acuta e di bio-accumulo, alcuni protozoi ciliati sono stati proposti come bioindicatori d'inquinanti, altri come bio-accumulatori per la *bioremediation*.

1.4. Ciliati del genere *Euplotes* e metalli pesanti

I protozoi ciliati appartenenti al genere *Euplotes* (classe Spirotrichea, ordine Euplotida) si trovano abbondantemente distribuiti in modo ubiquitario e sono facili da mantenere in coltura. Alcune specie sono in grado di formare cisti di resistenza e contengono dei batteri endosimbionti (Vannini *et al.*, 2004). Sul lato ventrale sono presenti i cirri (gruppi di ciglia fuse insieme), utilizzati per la locomozione, e delle membranelle orali, il cui scopo è quello di convogliare il cibo nel citostoma (Fig. 1). Si possono nutrire sia di batteri che di micro-alghe. La lunghezza delle varie specie di *Euplotes* varia tra circa 25 μm e circa 120 μm .



Figura 1. Fotografia di *Euplotes aediculatus*.

La maggior parte degli studi di tossicità acuta dei metalli pesanti in specie dulcacquicole del genere *Euplotes* è stata condotta da Madoni, a partire dagli anni '90. Con i suoi collaboratori, ha condotto degli studi in cui sono stati analizzati protozoi ciliati presenti negli impianti a fanghi attivi, tra cui alcune specie appartenenti al genere *Euplotes*. Più tardi, nel 2000 e nel 2006, ha indagato circa la tossicità acuta di metalli pesanti in protozoi ciliati campionati ed isolati da ambienti non contaminati. Madoni e collaboratori (1992; 1994) hanno valutato la tossicità acuta del cadmio, del rame, del mercurio e dello zinco in due specie di *Euplotes* campionate in un impianto a fanghi attivi di un depuratore di Reggio Emilia, *E. affinis* e *E. patella*, in termini di 24-h LC_{50} (o "Lethal Concentration 50%"), ossia la concentrazione di una sostanza tossica che provoca la morte del 50% degli organismi in studio, dopo 24 ore dalla somministrazione. Per quanto riguarda *E. affinis*, la 24-h LC_{50} nei confronti di Cd^{2+} è risultata di 0,400 mg/L, nei confronti di Cu^{2+} era di 0,064 mg/L, nei confronti di Hg^{2+} era di 0,190 mg/L, nei confronti di Zn^{2+} era di $3,1 \cdot 10^{-3}$ mg/L, nei confronti di Cr^{6+} era di 2,73 mg/L e nei confronti di Pb^{2+} è risultata di 2,32 mg/L. Nel caso di *E. patella*, la 24-h LC_{50} nei confronti di Cd^{2+} è risultata di 2,65 $\mu\text{g/L}$, nei confronti di Cu^{2+} era di $11 \cdot 10^{-3}$ mg/L, nei confronti di Hg^{2+} era di 0,125 mg/L, nei confronti di Zn^{2+} era di 0,05 mg/L, nei confronti di Cr^{6+} era di 9,47 mg/L, nei confronti di Pb^{2+} è risultata di 2,18 mg/L e nei confronti di Ni^{2+} era di 7,70 mg/L.

Ulteriori studi sui protozoi ciliati presenti negli impianti a fanghi attivi sono stati condotti da Salvadó e collaboratori (1997). In questi studi è stata misurata la tossicità acuta di Cd ed il relativo effetto sulla motilità di ciliati appartenenti alla specie *E. aediculatus*. La 24-h LC_{50} calcolata è risultata di 2,76 mg/L.

Madoni (2000) ha analizzato la tossicità acuta del nichel nei confronti di alcuni

protozoi ciliati campionati in un ambiente non contaminato, il fiume Stirione (Emilia Romagna). Le specie di *Euplotes* analizzate sono state identificate come *E. patella* ed *E. moebiusi*. La 24-h LC₅₀ calcolata con *E. patella* era di 7,7 mg/L, con *E. moebiusi* era di 1,28 mg/L. Madoni e collaboratori (2006) hanno valutato la tossicità acuta di un ceppo di *E. aediculatus* campionato in un ambiente non inquinato, il lago di Garda. La 24-h LC₅₀ nei confronti di Cd²⁺ è risultata di 0,59 mg/L, nei confronti di Cu²⁺ era di 0,01 mg/L, nei confronti di Cr⁶⁺ era di 0,10 mg/L, nei confronti di Ni²⁺ era di 0,03 mg/L e nei confronti di Pb²⁺ era di 0,50 mg/L.

Martín-González e collaboratori (2006) hanno isolato da un impianto a fanghi attivi di Butarque (Madrid, Spagna) alcuni protozoi ciliati: *Uronema nigricans*, *Drepanomonas revoluta* ed una specie non identificata appartenente al genere *Euplotes*. Il gruppo di ricerca ha misurato la 24-h LC₅₀ per i ciliati nei confronti di Cd, Zn, Cu e della miscela di Cd e Zn (in cui lo zinco è stato mantenuto a basse concentrazioni). Secondariamente è stato misurato il bio-accumulo dei suddetti metalli da parte dei ciliati in analisi: partendo da una coltura di 100 mL in fase esponenziale (10³ cellule/mL), sono state somministrate varie concentrazioni dei metalli. Dopo 24 ore è stato misurato nel surnatante la quantità di metalli rimasti, tramite uno spettrometro di massa. La quantità di metallo accumulato nelle cellule è stato calcolato per differenza. Infine tramite la microscopia a fluorescenza è stata messa in evidenza la presenza di depositi di Zn nelle cellule di *U. nigricans*, mentre in *D. revoluta* non è stata riscontrata alcuna differenza rispetto al controllo.

Rehman e collaboratori (2008, 2009) hanno campionato e isolato *Euplotes mutabilis* da acque di laghetti riceventi scarichi di reflui di industrie conciarie. La resistenza non è stata misurata tramite il parametro LC₅₀ ma osservando l'effetto dei metalli pesanti sulle curve di crescita. I metalli pesanti analizzati erano: Pb, Cd, Cr⁶⁺ e Cu. Sono stati somministrati 1 µg/L di metallo al giorno, fino a che le colture cellulari non smettevano di crescere. In presenza di Cr⁶⁺, i ciliati hanno continuato a crescere per 60 giorni e gli autori hanno utilizzato questo parametro per concludere che *E. mutabilis* è in grado di resistere a concentrazioni di 60 µg/L (gli altri risultati sono indicati in Tabella 3).

Tabella 3. Valori di resistenza di *E. mutabilis* nei confronti di tre metalli pesanti [da Rehman *et al.* (2008, 2009)].

Metallo	Resistenza (µg/L)
Controllo	75
Cd	22
Cu	22
Cr(VI)	60

Il saggio di bio-accumulo dei metalli in analisi è stato condotto su una coltura cellulare di 100 mL tenuta per 6 giorni a incubare con 5 o 10 µg/L del metallo in analisi. Dopodiché, l'analisi allo spettrometro ad assorbimento atomico è stata effettuata su aliquote prelevate dopo 0, 48, 72 e 96 ore. I valori di metalli sono stati misurati sia nel pellet cellulare che nel surnatante. Lo stesso esperimento di bio-accumulo è stato condotto in 10 L di acqua e in altrettanti 10 L di reflui industriali, a cui erano stati aggiunti 5 o 10 µg/L di ogni metallo pesante. L'analisi allo spettrometro è stata effettuata dopo 96 ore. Nell'esperimento in cui è stata utilizzata l'acqua è stato riscontrato un accumulo di Pb del 86% e di Cr⁶⁺ del 90%. Nell'esperimento con i reflui industriali è stato accumulato l'87% di Cd, il 92% di Ni e il 93% di Zn (Tab. 4).

Tabella 4. Accumulo di alcuni metalli pesanti da parte di una coltura di 100 mL di *E. mutabilis* [da Rehman *et al.* (2008, 2009)].

Metallo testato ($\mu\text{g/L}$)		Metallo assorbito (%)		Tempo (h)
Cd	Cr ⁶⁺	Cd	Cr ⁶⁺	
5	10	68	73	48
5	10	76	77	72
5	10	84	84	96

Chaundry e collaboratori (2011) hanno misurato la 24-h LC₅₀ di Cu su due specie di *Euplotes* isolate da acque riceventi gli scarichi da industrie conciarie: *E. aediculatus* ed *E. muscicola*. Il saggio svolto era simile a quello di Rehman e collaboratori (2008, 2009) ed è stato preso come valore di LC₅₀ estrapolando dalle curve di crescita la concentrazione di Cu corrispondente alla riduzione del 50% della popolazione. Il protocollo è completamente differente da quello utilizzato da altri autori, come Madoni e collaboratori (1992, 1994, 2000, 2006), Salvadó e collaboratori (1997) e Martín-González e collaboratori (2006). La misura del bio-accumulo è stata eseguita con lo stesso protocollo di Rehman e collaboratori (2009), con la differenza che in questo studio è stata somministrata una quantità di Cu pari al valore di LC₅₀ calcolata. Si riportano in seguito i valori di LC₅₀ e le percentuali di bio-accumulo misurati da diversi autori (Tabb. 5 e 6).

Tabella 5. Valori di LC₅₀ misurati in specie dulcacquicole di *Euplotes* nei confronti dei metalli Cd, Cr e Cu.

Specie	Metallo testato (mg/L)			Tempo (h)	Riferimento
	Cd	Cu	Cr ⁶⁺		
<i>E. affinis</i>	0,400	0,064	2,730	24	Madoni <i>et al.</i> (1992, 1994)
<i>E. patella</i>	2,650	0,010	9,47	24	Madoni <i>et al.</i> (1992, 1994, 2000)
<i>E. aediculatus</i>	0,590	0,010	0,100	24	Madoni <i>et al.</i> (2006)
<i>E. aediculatus</i>	2,760	n.d.	n.d.	24	Salvadó <i>et al.</i> (1997)
<i>E. aediculatus</i>	n.d.	48,610	n.d.	192	Chaundry <i>et al.</i> (2001)
<i>E. muscicola</i>	n.d.	48,160	n.d.	192	Chaundry <i>et al.</i> (2011)
<i>Euplotes</i> sp.	0,700	4,800	n.d.	24	Martín-González <i>et al.</i> (2006)

n.d.: non determinato.

Tabella 6. Valori di bio-accumulo di Cd, Cr e Cu in specie dulcacquicole di *Euplotes*.

Specie	Metallo somministrato (mg/L)			Accumulo (%)			Tempo (h)	Riferimento
	Cd	Cu	Cr ⁶⁺	Cd	Cu	Cr ⁶⁺		
<i>E. aediculatus</i>	n.d.	46,0	n.d.	n.d.	57,0	n.d.	192	Chaundry <i>et al.</i> (2011)
<i>E. muscicola</i>	n.d.	46,0	n.d.	n.d.	56,0	n.d.	192	Chaundry <i>et al.</i> (2011)
<i>Euplotes</i> sp.	0,5 2,0	1,0 2,0	n.d.	90,0 79,4	23,6 12,6	n.d.	24	Martín-González <i>et al.</i> (2006)
<i>E. mutabilis</i>	10,0	n.d.	10,0	68,0	n.d.	73,0	48	Rehman <i>et al.</i> (2008, 2009)
<i>E. mutabilis</i>	10,0	n.d.	10,0	76,0	n.d.	77,0	72	Rehman <i>et al.</i> (2008, 2009)
<i>E. mutabilis</i>	10,0	n.d.	10,0	84,0	n.d.	84,0	96	Rehman <i>et al.</i> (2008, 2009)

n.d.: non determinato.

Alcuni studi riguardano l'effetto di metalli pesanti su specie marine di *Euplotes*. Viarengo e collaboratori (1997) hanno misurato le variazioni dei livelli di calcio (Ca) in *E. crassus*. Sia in seguito ad incubazione con Cu che con Hg, è stato riscontrato un incremento di Ca²⁺ citosolico libero nelle cellule trattate. Coppellotti (1998) ha studiato l'effetto di Cu su un ceppo di *E. vannus* campionato nella laguna di Venezia, inquinata da metalli pesanti. È stata misurata una tolleranza di 0,2 mg/mL ed un bio-accumulo di 239 mg/g di peso secco, dopo un'incubazione con 0,4 mg/mL di Cu. Coppellotti ha anche riscontrato un cambiamento dell'organizzazione delle membranelle, dei cirri, dell'apparato nucleare e del cortex, a seguito di un'incubazione con 0,4 mg/mL per 4 giorni. Gomiero e collaboratori (2012) hanno testato numerosi inquinanti organici ed inorganici su *E. crassus* e hanno valutato la mortalità e gli effetti sul tasso di crescita, sulla stabilità delle membrane lisosomiali e sul tasso di endocitosi. I metalli pesanti testati erano Cu e Hg. Per tutti gli inquinanti, il tasso di crescita diminuiva in modo significativo dopo 24 ore di esposizione. Le concentrazioni di 0,3 mg/L di Cu e di 2 µg/L di Hg in 24 ore di esposizione provocavano una diminuzione significativa della stabilità delle membrane lisosomiali. Da Silva e collaboratori (2014) hanno calcolato la 24-h LC₅₀ di Cu nei confronti di una specie marina non identificata, campionata nella Baia di Guanabara (Brasile), che riceve gli scarichi dei depuratori civili. Dai risultati si evince che entro un range di concentrazione di Cu somministrato (tra 0,05 mg/L e 0,009 mg/L), le cellule erano in grado di svilupparsi; questo perché il rame è un nutriente essenziale. Alle concentrazioni più alte testate, le cellule morivano. La LC₅₀ è stata calcolata in 24 ore ed è risultata di 0,04 mg/L. In un saggio di 48 ore, Kim e collaboratori (2011) hanno misurato l'inibizione della crescita di *E. crassus*, misurata in termini di EC₅₀ (concentrazione che inibisce la crescita del 50%), ottenendo i valori di 1,57 mg/L, 4,13 mg/L e 4,97 mg/L, rispettivamente per Cu, Pb e Zn. Gli stessi

autori hanno anche valutato, tramite una *real-time* PCR, l'espressione dei geni coinvolti nella protezione dallo stress ossidativo: questa aumentava dopo un trattamento con Cu e Zn, ma non in seguito alla somministrazione di Pb. Anche l'endocitosi era compromessa in modo significativo con la somministrazione dei metalli in analisi.

Di recente c'è stato un forte interesse sull'effetto e sul ruolo del tallio presso i Grandi Laghi dell'America settentrionale: sono state condotte indagini per capire come ed in che forma il tallio si spostasse nella catena alimentare, a partire dai microrganismi, in particolare le micro-alghe. Da alcuni studi si evince che le microalghe risentono di basse quantità di tallio, fino a 0,1 mg/L (Zitko *et al.*, 1975; Wallwork-Barber *et al.*, 1985). Recenti analisi dimostrano che le seguenti micro-alghe sono in grado di bio-accumulare Tl: *Synechococcus leopoliensis* (diatomea), *Oxyrrhis marina* (dinoflagellato) e *Ochromonas danica* (crisofita). È stato dimostrato che *Synechococcus leopoliensis* e *Chlorella* spp. accumulano attivamente Tl⁺ e la sua forma dimetilata. L'accumulo di Tl⁺ da parte delle suddette micro-alghe può essere inibita da K⁺ e da Ca²⁺ (Twining *et al.*, 2003; Twining, Twiss and Fisher, 2003; Twining *et al.*, 2004; Twiss *et al.*, 2004). Studi su protozoi ciliati dulcicoli non sono stati trovati. Per questo motivo sono state avviate delle indagini preliminari per valutare la tossicità acuta.

Scopo della Tesi

Attualmente sono state proposte molte soluzioni di *bioremediation* di metalli pesanti, in particolare ha ricevuto grande attenzione la *phytoremediation*, che prevede l'utilizzo di piante accumulatrici, le quali concentrano gli inquinanti al loro interno in specifici compartimenti, come ad esempio le ortensie che accumulano metalli nei fiori, assumendo la colorazione blu (Negishi *et al.*, 2012). Tuttavia, con questo sistema si pongono alcune problematiche, come la specificità del distretto dove vengono accumulati i metalli, lo smaltimento della biomassa, il tempo e lo spazio necessari allo sviluppo delle piante, elevati nel caso degli alberi. Una delle prime caratteristiche da considerare delle piante accumulatrici è dove si accumulano i metalli (fiori, foglie, ecc.) e se la totalità dell'inquinante si concentrerà qui. Solitamente una parte dei metalli non si accumula in uno specifico compartimento e ciò diminuisce l'efficienza del sistema. Un altro problema è rappresentato dallo smaltimento della biomassa: essa deve essere recuperata, il volume ridotto e infine deve essere stoccato in discarica. Maggiore è il volume, maggiori saranno i costi del trattamento.

Un'alternativa valida all'utilizzo delle piante è rappresentata dai microbi. Essi sono economici, facili da mantenere in coltura ed il loro sviluppo richiede un minor tempo di attesa rispetto ad una pianta, come un arbusto od un albero, che necessita di anni per svilupparsi prima di poter essere utilizzabile. Inoltre, con i microbi non è necessario comprendere in quale compartimento si accumulino i metalli, poiché si tratta di organismi unicellulari. Per lo stesso motivo si risolve il problema del volume della biomassa: essendo molto piccola, è necessario un minore spazio sia di stoccaggio, sia di impianti che di area, rispetto a quello necessario per le piante.

Alcuni autori hanno proposto lo sviluppo di appositi sistemi di *bioremediation* basati sull'utilizzo di microrganismi unicellulari. Tra i vari microrganismi proposti ci sono anche i protisti, in particolare le micro-alghe. Per quanto riguarda i protozoi ciliati, non sono stati sviluppati sistemi di *bioremediation* che ne fanno utilizzo. Per questo motivo e viste le potenzialità di alcune specie di protozoi ciliati nel resistere a concentrazioni anche elevate di diversi metalli pesanti, sarebbe interessante e potenzialmente utile indagare maggiormente in questo campo, con l'obiettivo finale di trovare una soluzione economica, semplice ed efficiente per un abbattimento biologico.

Fronte alle suddette considerazioni, con la presente tesi si vuole indagare se alcune specie dulcacquicole di protozoi ciliati del genere *Euplotes* possano essere idonee alla *bioremediation* da metalli pesanti. Da alcuni studi riportati in letteratura sembrerebbe che nel genere *Euplotes* vi siano delle specie in grado di accumulare attivamente al loro interno alte percentuali di metalli pesanti, quali Zn^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} , Cr^{6+} , Ni^{2+} e Cd^{2+} (Martín-González *et al.*, 2006; Rehman *et al.*, 2008, 2009). Le indagini riportate in letteratura si sono concentrate in particolare sulla valutazione della tossicità acuta dei metalli pesanti nei confronti di alcune specie appartenenti al genere *Euplotes*: *E. aediculatus*, *E. affinis*, *E. moebiusi*, *E. muscicola*, *E. mutabilis* ed *E. patella* (Madoni *et al.*, 1992, 1994, 2000, 2006; Salvadó *et al.*, 1997; Martín-González *et al.*, 2006; Rehman *et al.*, 2008, 2009; Chaundry *et al.*, 2011). Le specie in cui è stato misurato l'accumulo di metalli pesanti sono poche: *E. mutabilis*, isolata da un lago ricevente i reflui di numerose tannerie a Kasur (Pakistan) (Rehman *et al.*, 2008, 2009); *E. aediculatus* ed *E. muscicola*, campionate nei reflui industriali di Sialkot e di Kasur (Pakistan), rispettivamente (Chaundry *et al.*, 2011); mentre la specie di *Euplotes* isolata da un impianto a fanghi attivi di Butarque (Spagna) e analizzata da Martín-González e collaboratori (2006) non è stata identificata.

Nel presente studio è stata misurata la tossicità acuta di Cd^{2+} , Cr^{6+} e Cu^{2+} in tre specie dulcacquicole di *Euplotes*: *E. aediculatus*, *E. harpa* ed *E. octocarinatus*. Per ottenere informazioni circa la variabilità intra-specifica sono stati analizzati tre ceppi di *E. aediculatus* e due ceppi di *E. octocarinatus*. Sulla base dei risultati ottenuti, per ogni metallo è stato selezionato il ceppo più resistente e su questo è stato misurato il bio-accumulo, con l'obiettivo di capire se i ceppi selezionati possano essere sfruttati nella *bioremediation* di metalli pesanti.

2. MATERIALI E METODI

2.1. SCELTA DELLE SPECIE E DEI CEPPI

Nel presente studio sono state analizzate varie specie di protozoi ciliati dulcacquicoli appartenenti al genere *Euplotes*.

La selezione delle specie da utilizzare si è basata sui studi pubblicati riguardanti la tossicità acuta dei metalli pesanti ed il loro bio-accumulo nelle specie del genere *Euplotes*.

In particolare, è stata selezionata la specie *E. aediculatus* (Fig. 2), in quanto è risultata quella studiata da un maggior numero di diversi autori (Salvadó *et al.*, 1997; Madoni *et al.*, 2006; Chaundry *et al.*, 2011). I ceppi di *E. aediculatus* utilizzati dai tre autori, oltre a presentare una diversa origine geografica, erano caratterizzati da un diverso grado di inquinamento del sito di raccolta (Tab. 7). Il ceppo isolato da Madoni e collaboratori (2006) proveniva dal Lago di Garda (Italia), il ceppo analizzato da Salvadó e collaboratori (1997) da un processo a fanghi attivi (Spagna), mentre quello impiegato da Chaundry e collaboratori (2011) è stato raccolto da un lago in cui venivano riversati scarichi di tannerie (Pakistan).

Tabella 7. Origine dei ceppi di *Euplotes aediculatus* analizzati per la tossicità acuta di metalli pesanti.

Autore	Origine
Salvadó <i>et al.</i> (1997)	Campionato da fanghi attivi in Spagna
Madoni <i>et al.</i> (2006)	Campionato nel Lago di Garda, Italia
Chaundry <i>et al.</i> (2011)	Campionato in acque reflue delle tannerie di Sialkot, Pakistan

Con lo scopo di studiare eventuali variazioni intra-specifiche sia nella tossicità acuta dei metalli pesanti sia nel bio-accumulo e per effettuare un'analisi comparativa dei risultati ottenuti con quelli disponibili in letteratura, per la specie *E. aediculatus* sono stati selezionati tre ceppi di diversa origine geografica e provenienti da siti a diverso impatto ambientale (Tab. 8): il ceppo ZIP10rK1-2, campionato in un cratere vulcanico dell'Isola di Pasqua (Cile), il ceppo RoM8, proveniente dalle Montagne Rocciose del Colorado (Stati Uniti) ed il ceppo SPZ1, campionato alla foce del fiume Serchio (Pisa, Italia).

Allo scopo di ottenere informazioni aggiuntive su altre specie finora mai studiate, sono state selezionate anche *E. octocarinatus* ed *E. harpa*, per ciascuna delle quali sono stati selezionati, rispettivamente, due e un ceppo (Tab. 8). In particolare, per *E. octocarinatus* sono stati selezionati i ceppi VTN7, proveniente dal Vietnam, ed il ceppo 27(11)-III. Quest'ultimo è il risultato di un incrocio effettuato tra il ceppo 3-I, campionato nel 1977 da un Acquario di Steinfurt, vicino Berlino, ed il ceppo 11-II, campionato in un acquario del *Zoological Institute* di Monaco, nella primavera del 1978 (Heckmann *et al.*, 1986). Il ceppo di *E. harpa* selezionato era CIN4, proveniente dalla Cina (Tab. 8).

L'assegnazione dei ceppi alle appropriate specie è stata effettuata mediante l'utilizzo sia di metodologie morfologiche che molecolari.

Tabella 8. Origine dei ceppi di *Euplotes* analizzati nel presente studio.

Specie	Ceppo	Origine
<i>E. aediculatus</i>	2Ip10rk1-2	Cratere vulcanico Rano Kau, Isola di Pasqua
	RoM8	Rocky Mountains, Colorado, Stati Uniti
	SPZ1	Fiume Serchio, Pisa, Italia
<i>E. octocarinatus</i>	27(11)-III	Germania
	VTN7	Vietnam
<i>E. harpa</i>	CIN4	Cina



Figura 2. Fotografia di *Euplotes aediculatus*.

2.2. CONDIZIONI DI CULTURA

Tutti i ceppi selezionati erano mantenuti in provette ad una temperatura costante di 23 °C in terreno di coltura S.M.C. (Fig. 3). Questo è composto da terreno S.M.B. (Miyake e Beyer, 1973) e da altri sali, secondo quanto indicato da Kusch e Heckmann (1988). I ceppi erano cibati con una cadenza di circa una volta alla settimana con la micro-alga *Chlorogonium* sp. (Fig. 4) diluita in acqua minerale San Benedetto (Tab. 10). La micro-alga era mantenuta in coltura a 23 °C nello stesso terreno di coltura dei protisti ciliati, con cicli di luce/buio di 12 ore/12 ore.



Figura 3. Provette delle colture di *Euplotes aediculatus*, *Euplotes harpa* ed *Euplotes octocarinatus*.

Tabella 9. Composizione del terreno di coltura S.M.C.

Sale	Concentrazione
NaCl	1,50 mM
KCl	0,05 mM
MgSO ₄	0,1 0mM
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,40 mM
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,05 mM
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	2,00 mM
NaH ₂ PO ₄ ·12H ₂ O	2,00mM
MnCl ₂	0,50 mM
FeCl ₃	9,00 mM
NH ₄ NO ₃	1,25 mM

Tabella 10. Concentrazione delle sostanze disciolte in un litro di acqua San Benedetto.

Sostanze disciolte	Concentrazione (mg/L)
Bicarbonato	313,0
Ca	50,3
Mg	30,8
Silice	12,0
Nitrati	9,0
Na	6,0
Solfati	3,7
Cloruri	2,2
K	0,9
Fluoruri	<0,1
CO ₂	8,0
O ₂	6,4

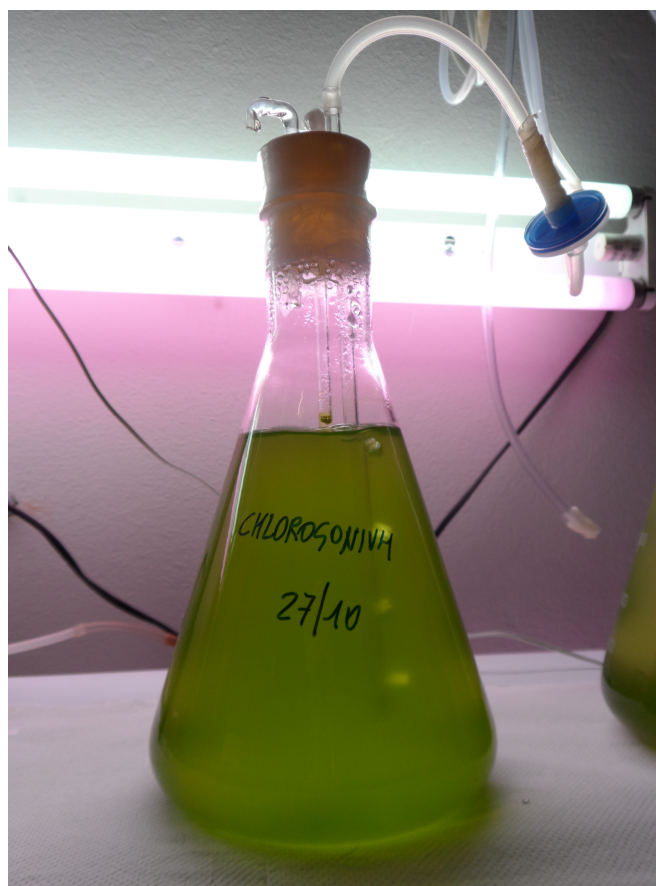


Figura 4. Coltura di *Chlorogonium* sp.

2.3. SCELTA DEI METALLI PESANTI

La selezione dei metalli pesanti da testare sulle diverse specie e ceppi si è basata sui dati riportati in letteratura. In particolare, la ricerca si è focalizzata sui lavori riguardanti la tossicità acuta dei metalli pesanti nei confronti delle specie dulcacquicole appartenenti al genere *Euplotes*. Come già riportato precedentemente, tra le specie di *Euplotes* selezionate, una sola, *E. aediculatus*, è stata maggiormente studiata da diversi autori (Salvadó *et al.*, 1997; Madoni *et al.*, 2006; Chaundry *et al.*, 2009). Allo scopo di effettuare un'analisi comparativa dei risultati ottenuti con quelli disponibili in letteratura, il criterio di scelta si è basato sui metalli pesanti già testati in questa specie. I metalli pesanti testati in *E. aediculatus* dai diversi autori sono riportati in Tabella 11.

In questo modo, sono stati selezionati gli ioni Cu^{2+} e Cd^{2+} , poiché entrambi sono stati utilizzati in due diversi studi. È stato selezionato anche il cromo esavalente perché molto tossico ma anche ampiamente utilizzato dall'uomo, per le sue svariate applicazioni a livello industriale, come ad esempio quelle conciarie, metalmeccaniche e galvaniche, molto diffuse in Toscana.

Tabella 11. Metalli pesanti testati su *Euplotes aediculatus*.

Autori	Metallo pesante testato
Salvadó <i>et al.</i> (1997)	Cd^{2+}
Madoni <i>et al.</i> (2006)	Cd^{2+}
	Cu^{2+}
	Cr^{6+}
	Ni^{2+}
	Pb^{2+}
Chaundry <i>et al.</i> (2011)	Cu^{2+}

Le soluzioni di metalli pesanti utilizzate nel presente studio (CdCl_2 anidro, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ e $\text{Tl}(\text{NO}_3)_2$ sono state acquistate presso la ditta Sigma-Aldrich (Milano, Italia).

2.4. SAGGIO DEL TERRENO DI COLTURA E DELLE SOLUZIONI DI METALLI PESANTI

I reagenti che costituiscono il terreno di coltura utilizzato per la crescita dei protisti ciliati (S.M.C.) potrebbero comportarsi da agenti chelanti per gli atomi metallici, dando origine alla formazione di complessi molto stabili in cui il metallo risulta circondato dal chelante. Una volta chelato, il metallo perderebbe le sue caratteristiche e quindi la tossicità.

Allo scopo di valutare se i metalli pesanti presenti nelle soluzioni utilizzate fossero chelati da uno o più reagenti del terreno di coltura S.M.C., per ogni soluzione di metallo pesante testato è stato effettuato un saggio, aggiungendo la soluzione di metallo nello stesso terreno di coltura utilizzato per la crescita dei protisti ciliati. Le concentrazioni di metallo pesante da utilizzare nel saggio del terreno di coltura sono state selezionate sulla base dei risultati per la 24-h LC_{50} ottenuti da altri autori in specie di *Euplotes* (Madoni *et al.*, 2006; Martín-González *et al.*, 2006).

Le concentrazioni selezionate erano 0,5 mg/L, 1 mg/L e 3 mg/L. Per ogni concentrazione di metallo pesante selezionata sono state preparate due soluzioni (da 1 mL ciascuna), una in acqua bidistillata e l'altra nel terreno di coltura S.M.C.

Per valutare la quantità di ione metallo in forma libera presente nelle diverse soluzioni preparate è stato utilizzato uno spettrometro al plasma, ICP-MS (Perkin-Elmer, Massachusetts, USA) e la tecnica della spettrometria di massa a plasma accoppiato induttivamente. Con questa tecnica è possibile misurare concentrazioni di molte sostanze, metalliche e non, fino a una parte per bilione. La torcia al plasma ionizza le particelle del campione, le quali vengono successivamente separate e rivelate dallo spettrometro di massa. Dal momento che la tossicità acuta dei diversi metalli pesanti sui protisti ciliati è stata valutata come 24-h LC_{50} (ved. "Valutazione della tossicità acuta"), le misurazioni allo spettrometro delle diverse soluzioni di metallo pesante sono state effettuate dopo 24 ore dalla loro preparazione. Per ogni misurazione, lo strumento effettuava tre repliche, calcolandone poi la media aritmetica.

Le soluzioni di metalli pesanti utilizzate negli esperimenti di tossicità acuta e di bio-accumulo sono costituite, oltre che dal metallo pesante di interesse, anche da altri composti (ioni), che potrebbero anch'essi presentare un certo grado di tossicità per i protisti ciliati analizzati. Ad esempio, la soluzione utilizzata per il rame ($CuSO_4$) contiene anche ioni solfato (SO_4^{2-}), quella per il cadmio ($CdCl_2$) contiene anche ioni cloruro (Cl^-) e quella per il cromo ($K_2Cr_2O_7$) contiene anche ioni potassio (K^+) e quella per il tallio contiene anche nitrati (NO_3^-).

Tuttavia, questi composti sono presenti sia nel terreno di coltura (S.M.C.), normalmente utilizzato per mantenere in coltura i ceppi di protisti ciliati, sia nell'acqua minerale utilizzata per diluire la micro-alga *Chlorogonium* sp., utilizzata come fonte di cibo per i ciliati. Lo ione solfato (SO_4^{2-}) è presente nel terreno di coltura S.M.C. alla concentrazione di 13 mg/L; lo ione cloruro (Cl^-) è presente alla concentrazione di 43 mg/L. Lo ione potassio (K^+) alla concentrazione di 2 mg/L e i nitrati (NO_3^-) sono concentrati 86,5 mg/L. Tali concentrazioni sono molto superiori rispetto a quelle presenti nelle soluzioni utilizzate negli esperimenti di tossicità acuta e di bio-accumulo, al punto da poter escludere una loro potenziale tossicità per i ciliati in esame.

Comunque, altri autori hanno verificato la tossicità di due dei composti di questo studio (SO_4^{2-} e Cl^-) in specie appartenenti allo stesso genere analizzato (*Euplotes*), non trovando alcun segno apprezzabile di tossicità (Martín-González *et al.*, 2006).

2.5. CURVE DI CRESCITA

Tutti i ceppi disponibili sono stati messi in coltura, partendo da un inoculo di coltura in fase stazionaria.

Allo scopo di calcolare il tasso di accrescimento delle cellule è stata determinata la curva di crescita. L'accrescimento dei ceppi era osservato periodicamente ogni 10 giorni circa, attraverso la conta delle cellule (ved. dopo).

Gli esperimenti effettuati nel presente studio sono stati svolti utilizzando i ceppi in fase di crescita esponenziale.

2.5.1. Conta delle cellule

Il conteggio delle cellule vive è stato eseguito, oltre che per l'ottenimento delle curve di crescita, anche per la valutazione della tossicità acuta (ved. dopo). In tutti i casi, il conteggio delle cellule veniva effettuato prelevando sei aliquote da 10 μL del terreno di coltura contenente le cellule e contando, mediante l'utilizzo di uno stereo-microscopio, il numero di cellule vive presenti in ciascuna aliquota. Dopo aver fatto una media aritmetica dei conteggi risultanti dalle sei repliche, il valore ottenuto era utilizzato, mediante l'applicazione di una proporzione, per ottenere la concentrazione di cellule presenti nel volume del campione in analisi.

2.6. SELEZIONE DELLE CONCENTRAZIONI DI METALLI PESANTI

Allo scopo di ottenere delle indicazioni sulla scelta delle concentrazioni di metalli pesanti da testare negli esperimenti di valutazione della tossicità acuta, per ogni metallo pesante e per ogni ceppo sono state eseguite delle indagini preliminari, utilizzando diverse concentrazioni di metallo, basate sui dati riportati in letteratura. Per tali indagini preliminari, si è deciso di utilizzare singole cellule, anziché delle mini-colture cellulari come è stato fatto per la valutazione della tossicità acuta (ved. dopo).

Singoli individui unicellulari sono stati prelevati dalle colture per mezzo di una micro-pipetta e inoculati in 500 μL di terreno di coltura S.M.C., utilizzando piastre sterili da 24 pozzetti (Figg. 5 e 6).

Per ogni ceppo e per ogni metallo pesante, erano testate tre concentrazioni diverse (T1, T2, T3) ed era allestito un controllo (C). Sia per il controllo che per i tre trattati erano preparate 10 repliche. Ciascuna concentrazione di metallo pesante era testata somministrando 1 μL della soluzione di metallo pesante ad un singolo individuo unicellulare presente in 500 μL di terreno di coltura S.M.C., all'interno di ogni pozzetto T. Il controllo era effettuato sostituendo il metallo pesante in analisi con 1 μL di terreno di coltura S.M.C. in ogni pozzetto C.

Le piastre erano conservate a 23 °C per 24 ore. Allo scopo di evitare l'evaporazione dei contenuti liquidi presenti nei pozzetti, le piastre erano, inoltre, incubate in una camera umida.

Trascorse le 24 ore, tutti i pozzetti erano osservati ad uno stereo-microscopio, per verificare la presenza (sopravvivenza) o meno (mortalità) degli individui unicellulari alle diverse concentrazioni di metallo testate: è stata valutata quale concentrazione di metallo provocava la morte di almeno il 50% degli individui (assenza di cellule in almeno 5 delle 10 repliche effettuate).

Nei casi in cui non si ottenevano valori di mortalità pari o superiori al 50%, le indagini preliminari erano ripetute, utilizzando concentrazioni maggiori di metallo pesante.

Una volta individuate le concentrazioni di metallo cercate, esse venivano utilizzate per selezionare una serie di cinque diverse concentrazioni di metallo, da testare nei successivi esperimenti di tossicità acuta.

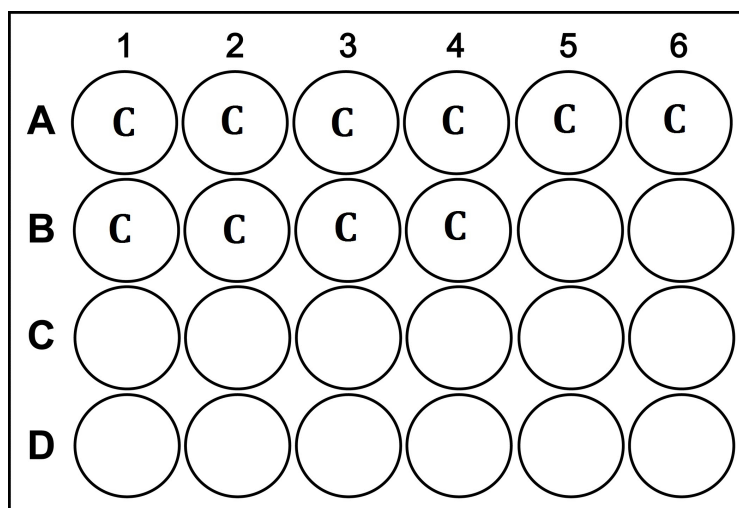


Figura 5. Piastra a 24 pozzetti utilizzata per il controllo (C) nelle indagini preliminari volte alla selezione delle concentrazioni di metalli pesanti.

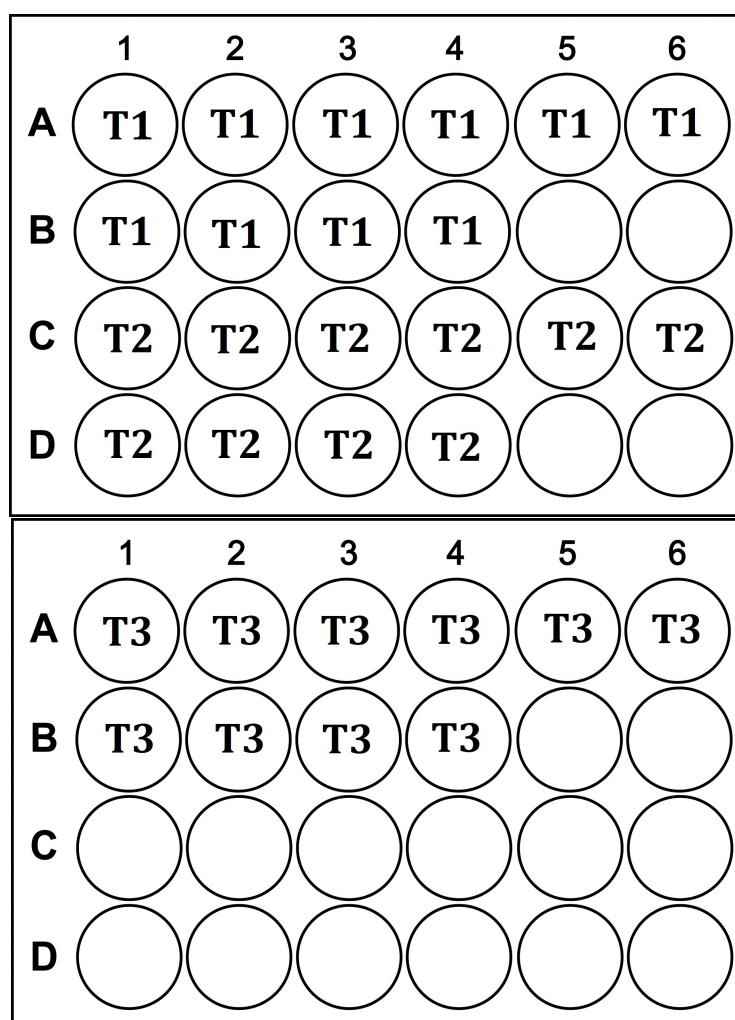


Figura 6. Piastre a 24 pozzetti utilizzata per le tre concentrazioni di metallo testate (T1, T2, T3) nelle indagini preliminari volte alla selezione delle concentrazioni di metalli pesanti.

2.7. VALUTAZIONE DELLA TOSSICITÀ ACUTA

La tossicità acuta è l'effetto tossico che si instaura in seguito all'esposizione di un organismo ad una sostanza, in un breve periodo di tempo. Per poterla quantificare si calcola il parametro chiamato "*Lethal Concentration 50%*" (LC_{50}). La LC_{50} è la concentrazione della sostanza tossica che provoca la morte del 50% degli organismi in studio.

La LC_{50} può essere calcolata per tempi diversi di esposizione: 24, 48, 72 o 96 ore. In questo studio, sono state prelevate dalle colture circa 1.300 cellule del ceppo in analisi e sono state inoculate in 1 mL di terreno di coltura S.M.C. (ved. "Conta delle cellule"), utilizzando piastre sterili da 24 pozzetti (Fig. 7).

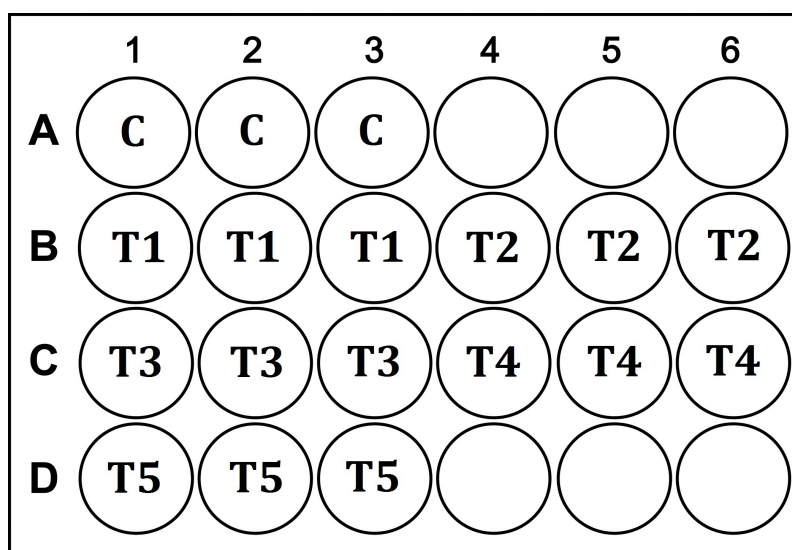


Figura 7. Piastra a 24 pozzetti utilizzata negli esperimenti di tossicità acuta. C. Controllo. T1, T2, T3, T4, T5. Concentrazioni di metallo testate.

Per ogni ceppo e per ogni metallo pesante, erano testate le cinque concentrazioni diverse di metallo (T1, T2, T3, T4, T5) risultate dalle indagini preliminari (ved. "Selezione delle concentrazioni di metalli pesanti") ed è stato effettuato contestualmente un controllo (C). Sia per il controllo che per le diverse concentrazioni di metallo testate, erano preparate 3 repliche, come in letteratura. Ciascuna delle 5 concentrazioni selezionate di metallo pesante era saggiata aggiungendo 1 μ L di una soluzione di metallo (tenendo conto della diluizione in 1 mL) in ogni corrispondente pozzetto T1, T2, T3, T4 e T5. Il controllo era effettuato sostituendo il metallo pesante con 1 μ L di terreno di coltura S.M.C. in ogni pozzetto C.

Le piastre erano conservate a 23 °C per 24 ore. Allo scopo di evitare l'evaporazione dei contenuti liquidi presenti nei pozzetti, le piastre erano, inoltre, incubate in una camera umida.

Trascorse le 24 ore, tutti i pozzetti erano osservati ad uno stereo-microscopio, per effettuare il conteggio degli individui unicellulari (ved. "Conta delle cellule").

Per ogni replica, è stata calcolata la sopravvivenza cellulare (espressa in percentuale) moltiplicando per 100 il rapporto tra la concentrazione di cellule sopravvissute e quella di cellule iniziali (esprese in numero di cellule/mL).

$$\frac{\text{Concentrazione cellule sopravvissute (cell/ml)}}{\text{Concentrazione cellule iniziali (cell/ml)}} \cdot 100$$

Per ciascuna delle tre repliche, è stata calcolata la media aritmetica della sopravvivenza cellulare (espressa in percentuale), con i relativi valori di deviazione standard e di Coefficiente di Variazione (C.V.) (espresso in percentuale). La deviazione standard è una misura della dispersione delle osservazioni dalla media aritmetica. Più è bassa e più affidabile è la media calcolata. Il Coefficiente di Variazione, detto anche deviazione standard relativa, è un altro indice di dispersione e si calcola dividendo la deviazione standard per la media e moltiplicando il risultato per 100. Più i valori si avvicinano a 0 e minore è la dispersione dei valori delle repliche intorno alla media ottenuta. Valori di C.V. superiori a 50% indicano una dispersione troppo elevata dei valori delle repliche e, dunque, la media non è attendibile.

Per ciascuna delle tre repliche, è stata calcolata la 24-h LC₅₀, tramite il metodo della regressione lineare. Precisamente, con il programma Microsoft Excel sono stati riportati in grafico i valori della sopravvivenza cellulare (sulle asse delle ordinate) in funzione delle concentrazioni di metallo pesante testate (sulle asse delle ascisse). Tramite il programma è stata calcolata la retta di regressione lineare e la relativa equazione:

$$y = ax + b$$

Dove x corrisponde alla concentrazione di metallo pesante testata ed y alla relativa percentuale di sopravvivenza cellulare. Impostando y = 50 e risolvendo l'equazione si ottiene la concentrazione di metallo che porta alla morte del 50% delle cellule, ossia la LC₅₀.

$$x = \frac{50 - b}{a}$$

Sui valori di LC₅₀ delle tre repliche è stata calcolata la media aritmetica, la deviazione standard ed il C.V., ottenendo così il valore di 24-h LC₅₀ per ciascun ceppo analizzato.

Per ottenere la 24-h LC₅₀ nelle due specie *E. aediculatus* ed *E. octocarinatus*, di cui sono stati studiati 3 e 2 ceppi, rispettivamente, è stata calcolata la media aritmetica dei valori di 24-h LC₅₀ ottenuti in ogni ceppo con-specifico, con i rispettivi valori di deviazione standard e di C.V.. Nel caso della specie *E. harpa*, in cui è stato analizzato un solo ceppo, il valore di 24-h LC₅₀ della specie corrispondeva a quello ottenuto nell'unico ceppo analizzato.

Allo scopo di valutare la variabilità intra- e inter-specifica, i valori medi di 24-h LC₅₀ ottenuti per ogni ceppo e per ogni specie sono stati sottoposti ad un'analisi statistica parametrica e non-parametrica. L'analisi della variabilità inter-specifica è stata effettuata tramite l'ispezione delle medie. Per l'analisi della variabilità intra-specifica in *E. aediculatus*, in cui il numero di ceppi è pari a 3, sono state effettuate l'analisi parametrica ANOVA a una via e l'analisi non-parametrica di Kruskal-Wallis, il quale è un test equivalente ma per dati non distribuiti normalmente. Per l'analisi della variabilità intra-specifica in *E. octocarinatus* è stato effettuato il t-Student, un test parametrico che confronta due medie. Poiché il numero di repliche era pari a 3, non è stato possibile

svolgere il test non-parametrico di Wilcoxon, l'equivalente al t-Student che necessita di almeno 5 osservazioni. Esiste un'analisi che confronta le medie di due gruppi piccoli, ma è sconsigliato poiché poco robusto.

Il metodo parametrico ANOVA a una via permette di confrontare i valori medi ottenuti entro e tra i diversi gruppi (specie), per sapere se tra di loro vi sia una differenza statisticamente significativa. Sono state calcolate le devianze (SS) e le varianze (MS) sia all'interno dei gruppi che tra di essi. È stata calcolata la statistica F facendo il rapporto tra varianza tra gruppi e varianza entro gruppi. La statistica calcolata è stata confrontata con la F critica dall'apposita tabella. Se $F > F_{crit}$, significa che c'è una differenza statisticamente significativa tra i gruppi confrontati.

Il metodo non-parametrico di Kruskal-Wallis verifica l'uguaglianza tra le mediane dei gruppi, per verificare che non provengano dalla stessa popolazione. Vengono assegnati i ranghi ad ogni osservazione, da 1 a N in ordine crescente. Per ottenere la statistica H si devono calcolare gli scarti quadratici tra la media dei ranghi di gruppo e il rango medio generale e si deve normalizzare. La statistica H è il rapporto tra la somma degli scarti calcolati per ogni gruppo con il valore normalizzato dello scarto.

Il metodo t-Student consente di confrontare due medie tra di loro. Viene stimata la varianza su due campioni e viene calcolata la statistica t, la quale deve essere confrontata al valore t critico nella relativa tabella. Se $t > t_{crit}$, significa che tra le due medie c'è una differenza statisticamente significativa.

2.8. SAGGIO DI BIO-ACCUMULO

La capacità di accumulo delle specie in esame è stata determinata prendendo in considerazione, per ciascun metallo, il ceppo che mostrava il maggiore valore di 24-h LC₅₀, così come determinato nella valutazione della tossicità acuta. Il saggio di bio-accumulo è stato effettuato inoculando 1 mL di coltura, alla concentrazione di 3.000 cellule/mL circa, in piastre da 24 pozzetti (Fig. 8). La concentrazione di metallo utilizzata per valutare la capacità di accumulo nelle colture trattate (T) era pari alla 24-h LC₅₀, precedentemente determinata per ciascun ceppo e per ciascun metallo nella valutazione della tossicità acuta. Sono stati impiegati due controlli, uno negativo (C -) ed uno positivo (C +). Le colture trattate erano costituite da 1 mL di coltura a cui veniva aggiunto 1 µL della soluzione di metallo alla concentrazione selezionata, tenendo conto della diluizione (con ioni metallici e ciliati). Il controllo negativo era costituito da 1 mL di coltura a cui veniva aggiunto 1 µL di terreno di coltura S.M.C. (senza ioni metallici, ma con ciliati). Il controllo positivo era costituito da 1 mL di terreno di coltura S.M.C. a cui veniva aggiunto 1 µL della soluzione di metallo alla concentrazione selezionata (con ioni metallici, ma senza ciliati) ed il suo scopo era quello di valutare la bontà dei lavaggi (vedere dopo). Ogni esperimento era eseguito in triplice copia. Le piastre erano conservate a 23 °C per 24 ore. Allo scopo di evitare l'evaporazione dei contenuti liquidi presenti nei pozzetti, le piastre erano, inoltre, incubate in una camera umida.

Allo scopo di separare la biomassa cellulare dal terreno di coltura, il contenuto di ciascun pozzetto era trasferito all'interno di eppendorf e queste erano centrifugate a 5.000 x g a 4° C per 3 minuti. Dopo aver eliminato i surnatanti, i pellet sono stati lavati 3 volte con 900 µl di acqua ultrapura e digeriti con HNO₃ concentrato.

Per valutare le quantità di ioni metallici in forma libera presenti nei diversi campioni preparati è stato utilizzato lo stesso spettrometro al plasma, precedentemente utilizzato nel saggio del terreno di coltura. Sia i controlli (C + e C -) che le colture trattate (T) hanno subito il medesimo trattamento di preparazione.

Per ogni campione analizzato sono stati valutati i seguenti valori.

- CMI: Concentrazione di Metallo Iniziale (pari alla 24-h LC₅₀), espressa in µg/L.
- CMR: Concentrazione di Metallo Rimossa dalle cellule (dopo 24 ore di trattamento), espressa in µg/L.
- CMF: Concentrazione di Metallo Finale (dopo 24 ore di trattamento), stimata come CMR – CMI.
- B: Percentuale di bio-accumulo dello ione metallico, stimata come:

$$\frac{\text{CMR (T)} - \text{CMR (C-)}}{\text{CMI}} \cdot 100$$

L'aumento delle concentrazioni di ioni metallici nei pellet delle colture cellulari trattate rispetto ad entrambi i controlli è stato interpretato come capacità di elaborazione dei metalli da parte dei protisti ciliati.

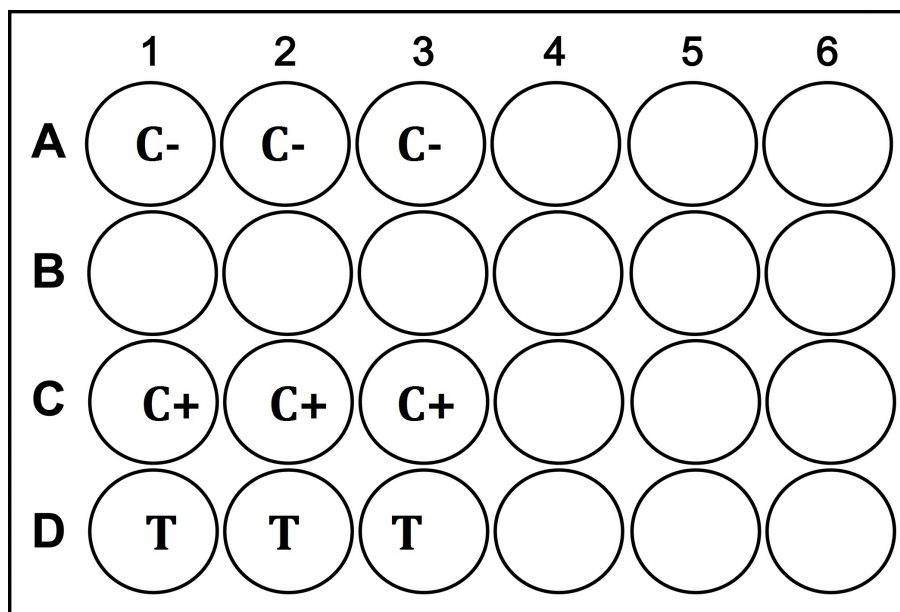


Figura 8. Schema della piastra a 24 pozzetti utilizzata nel saggio di bio-accumulo. **C-**. Controllo negativo (senza ioni metallici, ma con ciliati). **C+**. Controllo positivo (con ioni metallici, ma senza ciliati). **T**. Colture trattate (con ioni metallici e ciliati).

3. RISULTATI

3.1. CURVE DI CRESCITA

I tassi di accrescimento cellulare dei ceppi utilizzati nel presente studio sono riportati nei grafici (Figg. 9 - 11).

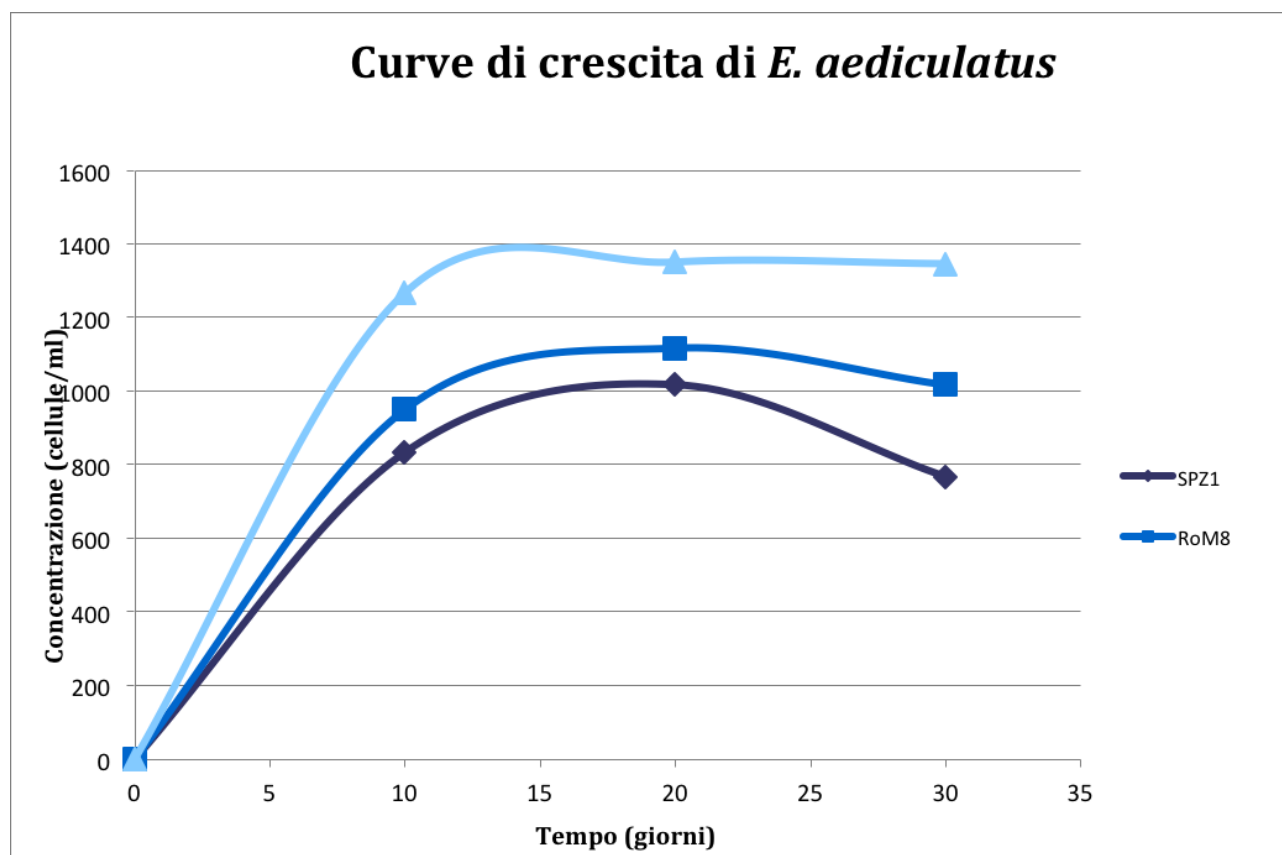


Figura 9. Curve di crescita calcolate per i tre ceppi di *Euplotes aediculatus* analizzati.

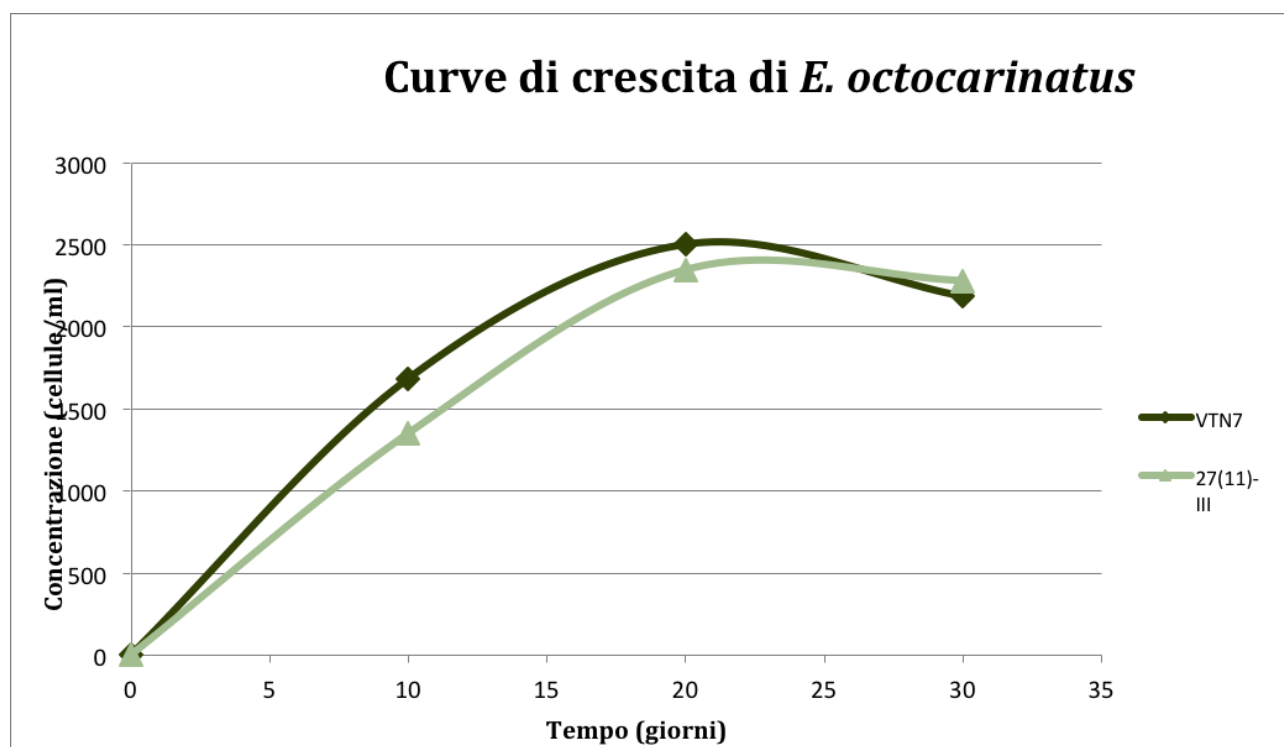


Figura 10. Curve di crescita calcolate per i due ceppi di *E. octocarinatus* analizzati.

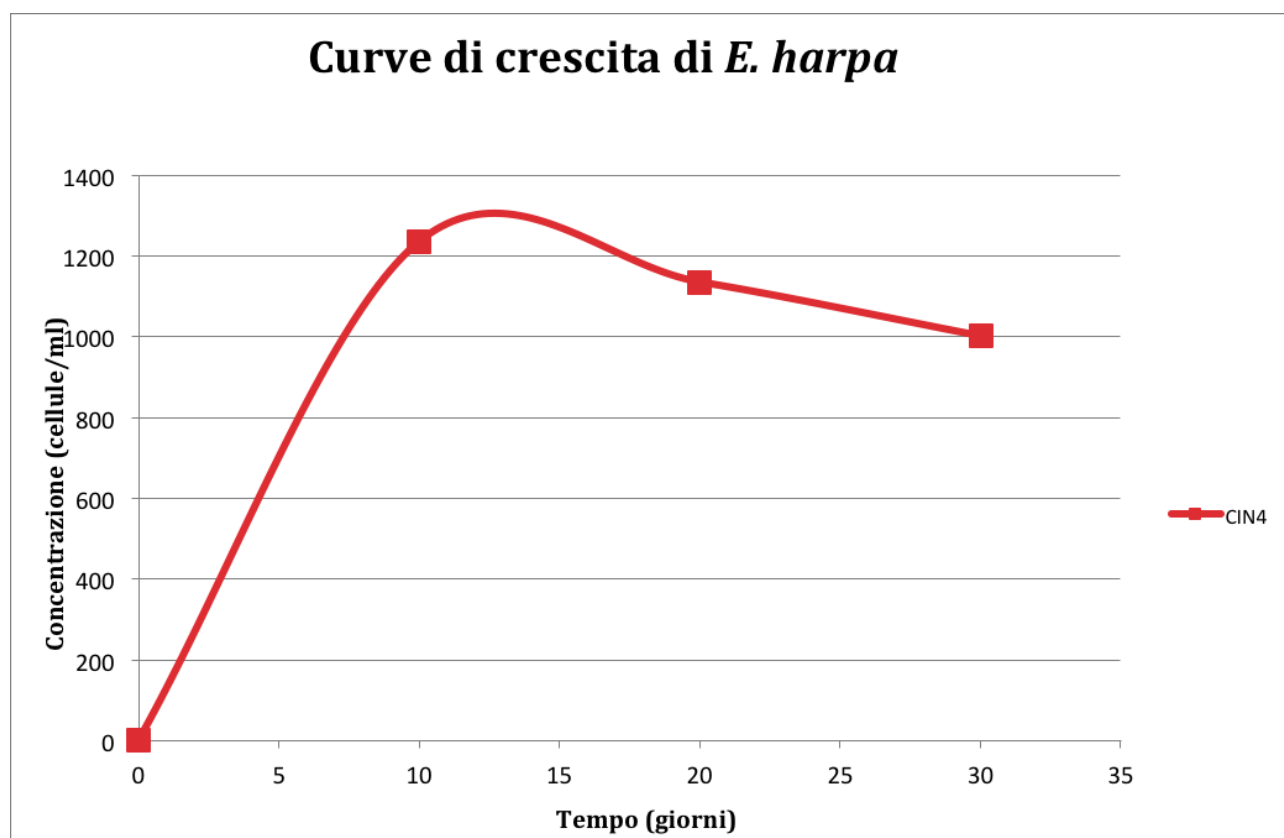


Figura 11. Curva di crescita calcolata per il ceppo di *E. harpa* analizzato.

I ceppi SPZ1, RoM8 e 2IP10rK1-2 di *E. aediculatus* mostravano il massimo accrescimento cellulare dopo 20 giorni dall'inoculo della coltura (Fig. 9). Il numero di cellule dei ceppi SPZ1, RoM8 e 2IP10rK1-2 di *E. aediculatus* aumentava fino a 1.020, 1.120 e 1.350 cellule/mL, rispettivamente. Il ceppo SPZ1 dopo 10 giorni aumentava a 1.700 cellule/mL e nei 20 giorni successivi diminuiva di 2,4 volte. Nello stesso periodo anche RoM8 diminuiva fino a 700 cellule/mL al giorno 30.

I ceppi VTN7 e 27(11)-III di *E. octocarinatus* mostravano il massimo accrescimento cellulare entrambi dopo 20 giorni dall'inoculo della coltura (Fig. 10). Il numero di cellule dei ceppi VTN7 e 27(11)-III di *E. octocarinatus* aumentava dal tempo dell'inoculo a 2.500 e 2.350 cellule/mL, rispettivamente.

Il ceppo CIN4 di *E. harpa* mostrava il massimo accrescimento cellulare dopo 10 giorni dall'inoculo della coltura (Fig. 11). Il numero di cellule aumentava dal tempo dell'inoculo a 1.250 cellule/mL.

3.2. METALLO PESANTE: Cu²⁺

3.2.1. Saggio del terreno di coltura

Come fonte dello ione Cu²⁺ era utilizzata la soluzione CuSO₄·5H₂O.

I risultati del saggio del terreno di coltura, effettuato per valutare se lo ione metallico presente nella soluzione utilizzata fosse chelato da uno o più reagenti del terreno di coltura S.M.C., sono riportati in Tabella 12.

Tabella 12. Concentrazioni di ioni Cu²⁺ testate in acqua bidistillata e in terreno di coltura S.M.C., dopo 24 ore dalla loro preparazione.

Concentrazione Cu ²⁺ testata (mg/L)	Concentrazione Cu ²⁺ in acqua bidistillata (mg/L)*	Concentrazione Cu ²⁺ in S.M.C. (mg/L)*
0,5	0,4781	0,4564
1,0	0,9924	0,9961
3,0	3,1534	3,3696

*. Misurata dopo 24 ore dalla preparazione.

Come si può osservare, i risultati ottenuti indicano che non c'è alcun effetto apprezzabile di chelazione dello ione metallico da parte del terreno di coltura utilizzato per la crescita dei protisti ciliati.

3.2.2. Selezione delle concentrazioni di metallo pesante

I risultati relativi alle indagini preliminari effettuate per selezionare le concentrazioni di ione metallico da utilizzare negli esperimenti di tossicità acuta sono riportati in Tabella 13.

Tabella 13. Mortalità valutata nei vari ceppi di *Euplotes* analizzati, a diverse concentrazioni di ioni Cu^{2+} .

Specie	Ceppo	Concentrazione Cu^{2+} testate ($\mu\text{g/L}$)	Mortalità (numero di individui morti in 10 repliche)*
<i>E. aediculatus</i>			
	2IP10rK1-2	0 (controllo)	0
		40	3
		80	8
		160	10
	RoM8	0 (controllo)	0
		20	1
		40	8
		80	9
	SPZ1	0 (controllo)	0
		40	3
		80	4
		160	10
<i>E. octocarinatus</i>			
	27(11)-III	0 (controllo)	0
		87,5	2
		175	7
		350	9
	VTN7	0 (controllo)	0
		60	7
		180	9
		360	10
<i>E. harpa</i>			
	CIN4	0 (controllo)	0
		5	6
		10	7
		40	9

*. Valutata dopo 24 ore dalla somministrazione dello ione metallico.

Le concentrazioni che provocavano la morte di almeno il 50% degli individui (assenza di cellule in almeno 5 delle 10 repliche effettuate) sono mostrate in carattere grassetto.

Sulla base dei risultati ottenuti, per ogni ceppo sono state individuate le concentrazioni di ione metallico che provocavano la morte di almeno il 50% degli individui (assenza di cellule in almeno 5 delle 10 repliche effettuate). Tali concentrazioni, a loro volta, sono state utilizzate per selezionare una serie di cinque diverse concentrazioni di metallo (Tabella 14), da utilizzare negli esperimenti di tossicità acuta.

Tabella 14. Concentrazioni di ioni Cu²⁺ selezionate, da utilizzare negli esperimenti di tossicità acuta.

Specie	Ceppo	Concentrazioni Cu²⁺ selezionate (µg/L)
<i>E. aediculatus</i>		
	2IP10rK1-2	62 140 180 200 250
	RoM8	10 20 40 80 160
	SPZ1	10 20 40 80 160
<i>E. octocarinatus</i>		
	27(11)-III	400 500 600 700 800
	VTN7	40 60 130 200 400
<i>E. harpa</i>		
	CIN4	10 20 40 80 160

3.2.3. Valutazione della tossicità acuta

Le percentuali di sopravvivenza in funzione delle concentrazioni di Cu^{2+} somministrate, con le relative deviazioni standard, sono riportate, per ogni ceppo e specie analizzati, nei grafici (Figg. 12 – 17). Per ogni grafico sono, inoltre, mostrati la relativa retta di regressione lineare ed il coefficiente R^2 calcolati.

E. aediculatus - ceppo 2IP10rK1-2

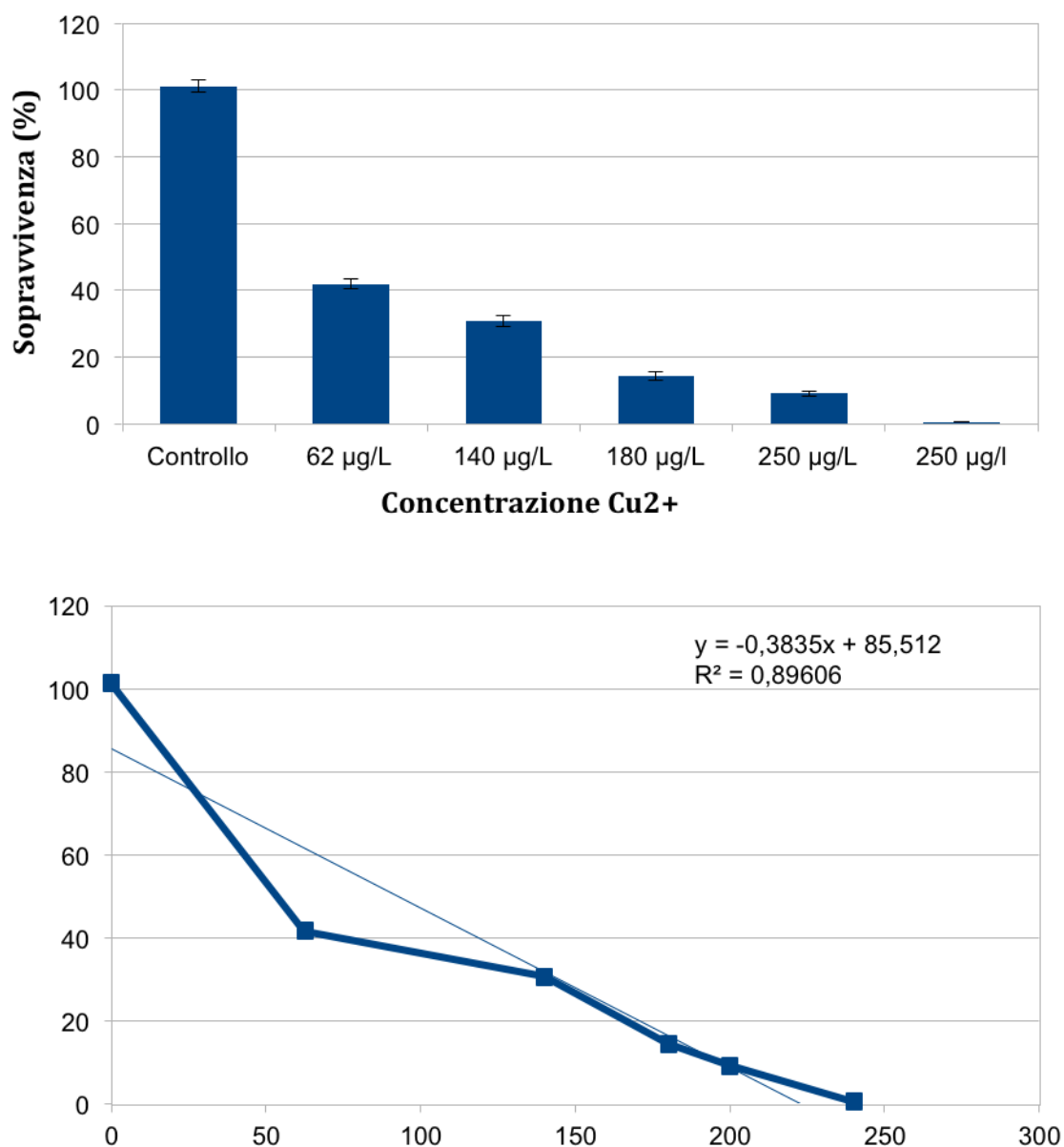


Figura 12. Percentuali di sopravvivenza cellulare alle diverse concentrazioni di Cu^{2+} testate e relativa retta di regressione per il ceppo 2IP10rK1-2 della specie *Euplotes aediculatus*.

***E. aediculatus* - ceppo RoM8**

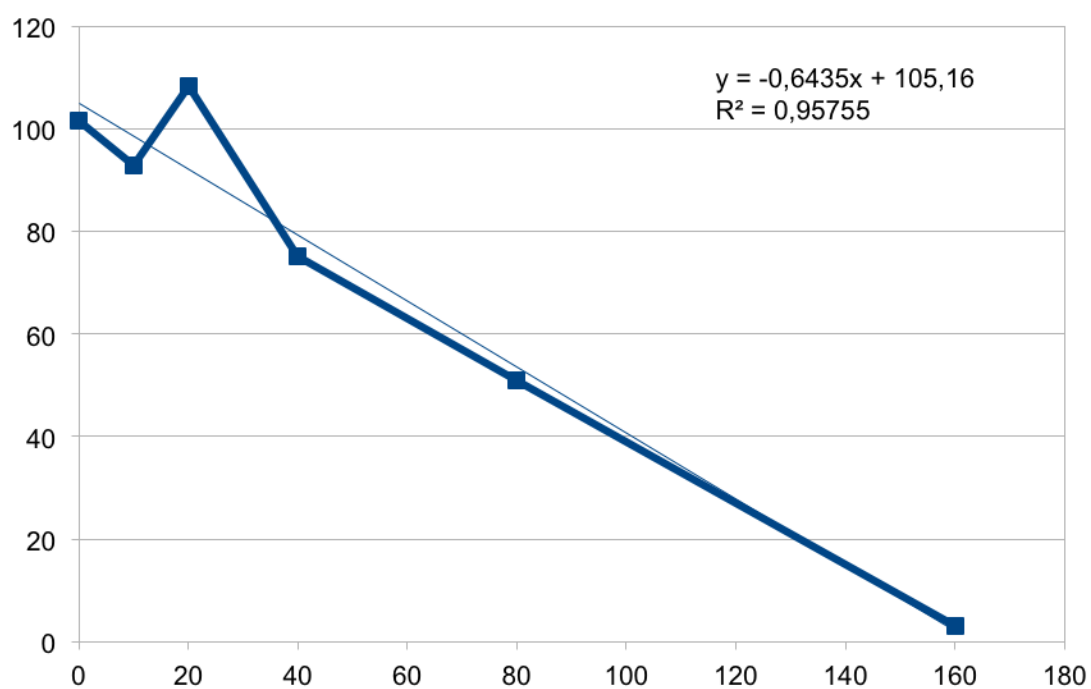
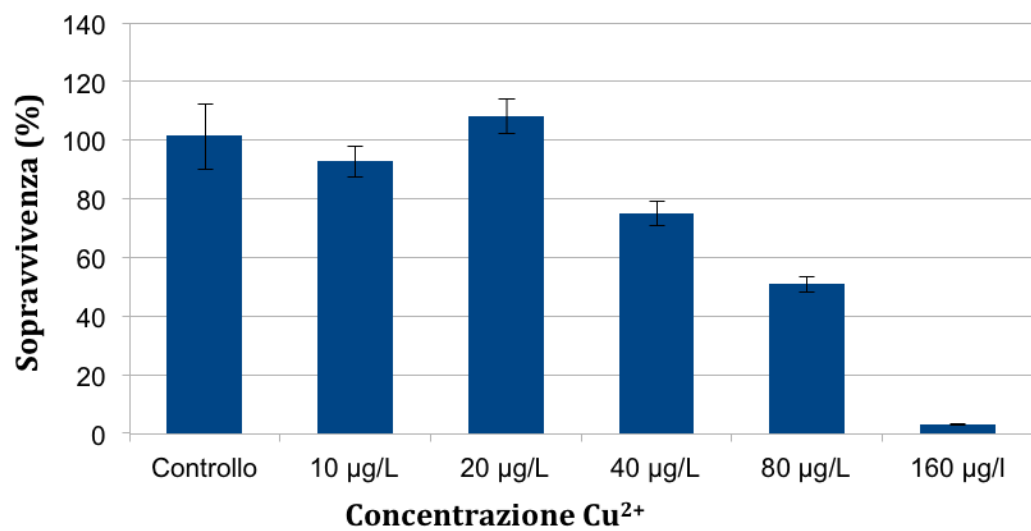


Figura 13. Percentuali di sopravvivenza cellulare alle diverse concentrazioni di Cu²⁺ testate e relativa retta di regressione per il ceppo RoM8 della specie *Euplotes aediculatus*.

***E. aediculatus* - ceppo SPZ1**

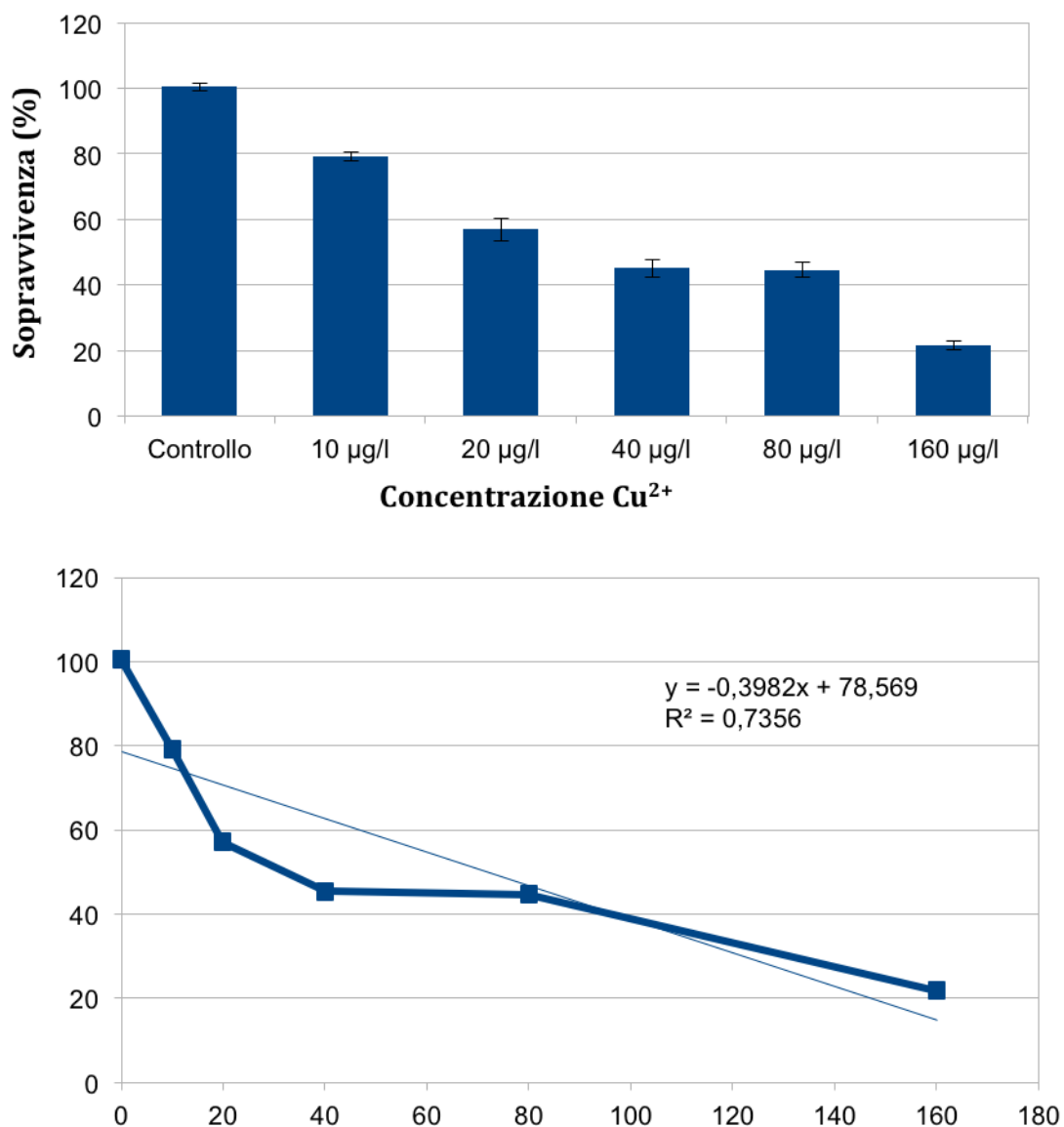


Figura 14. Percentuali di sopravvivenza cellulare alle diverse concentrazioni di Cu^{2+} testate e relativa retta di regressione per il ceppo SPZ1 della specie *Euplotes aediculatus*.

***E. octocarinatus* - ceppo 27(11)-III**

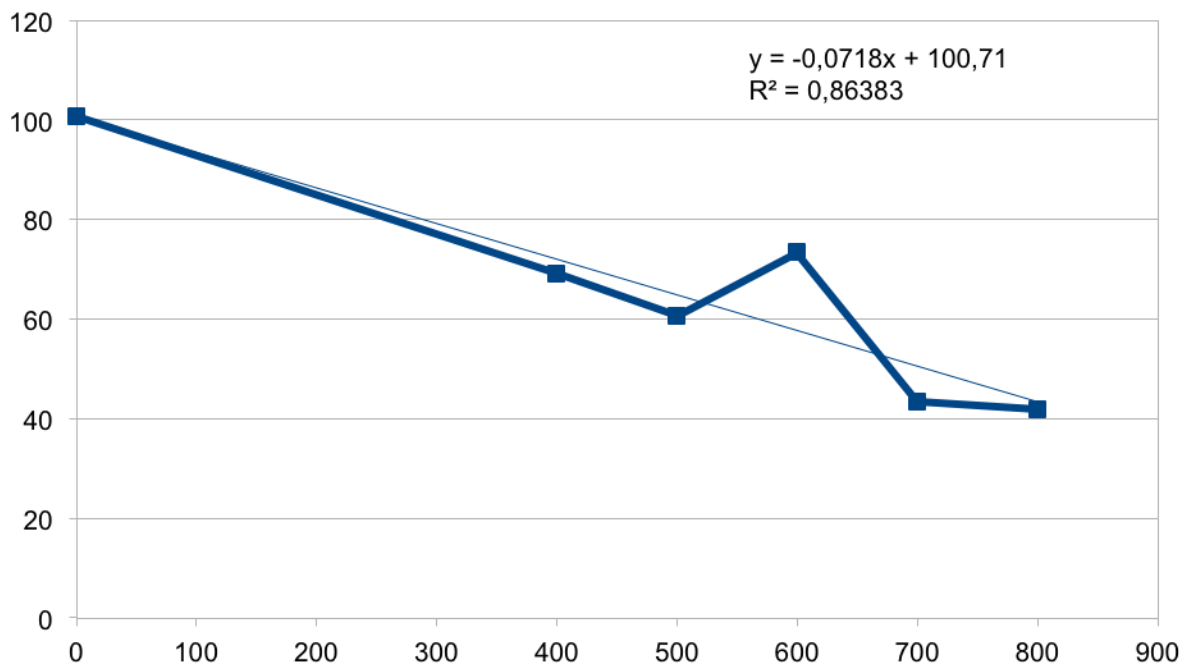
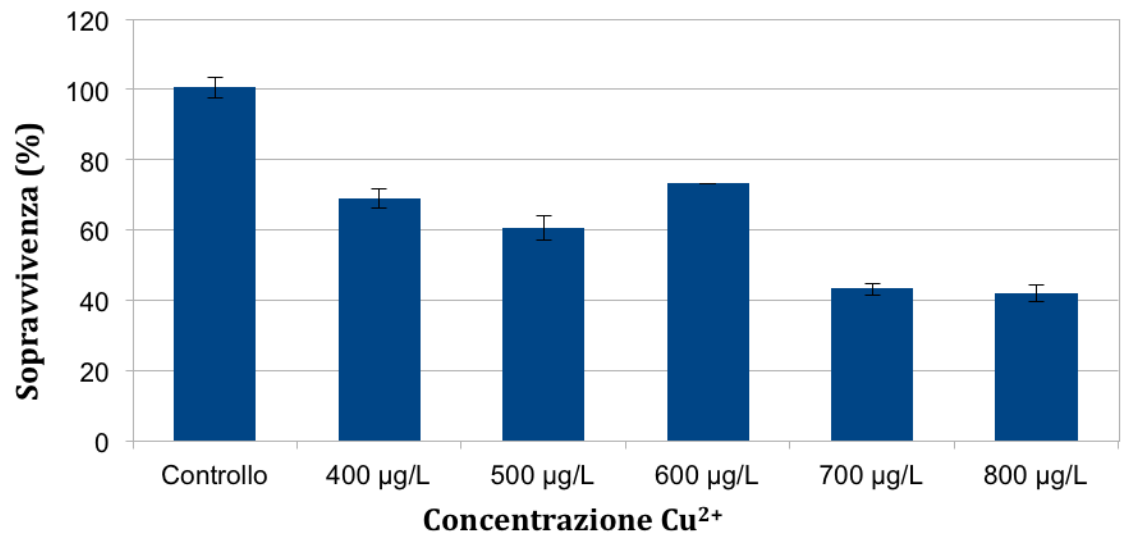


Figura 15. Percentuali di sopravvivenza cellulare alle diverse concentrazioni di Cu²⁺ testate e relativa retta di regressione per il ceppo 27(11)-III della specie *Euplotes octocarinatus*.

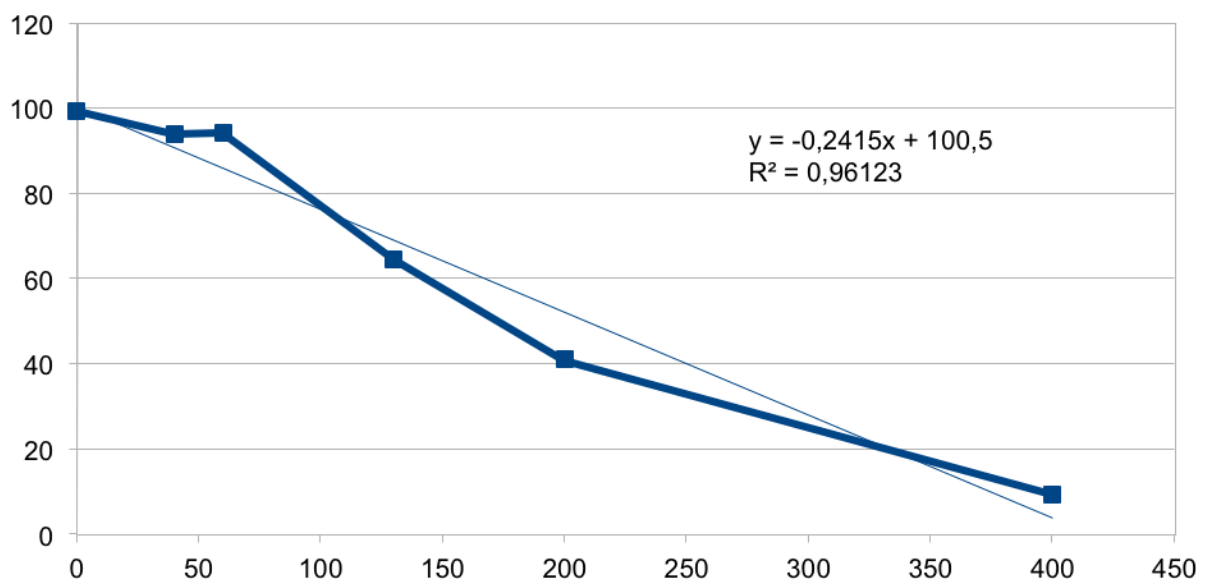
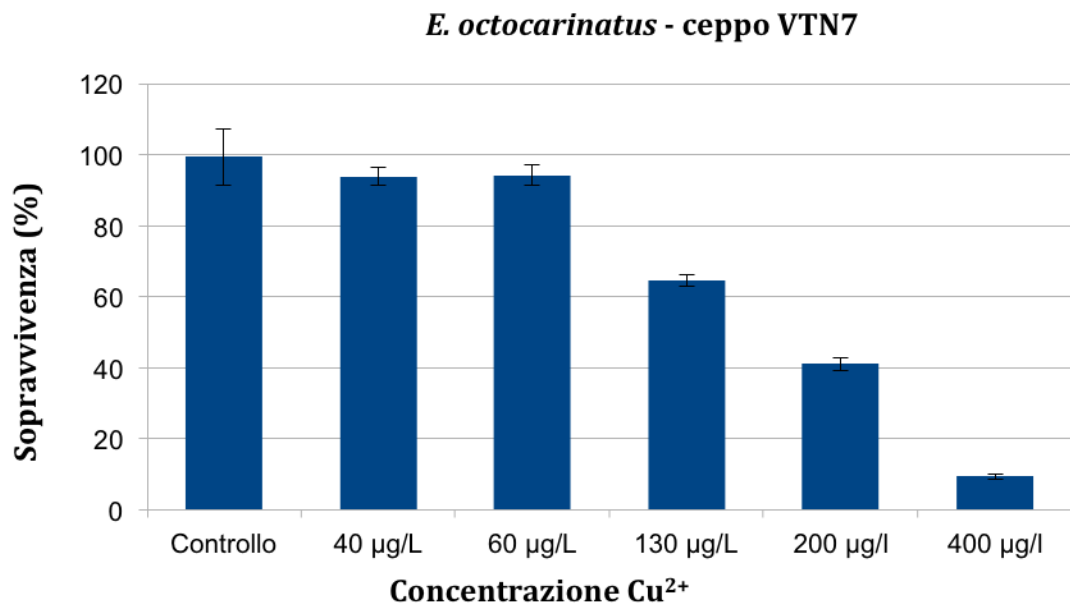


Figura 16. Percentuali di sopravvivenza cellulare alle diverse concentrazioni di Cu²⁺ testate e relativa retta di regressione per il ceppo VTN7 della specie *Euplotes octocarinatus*.

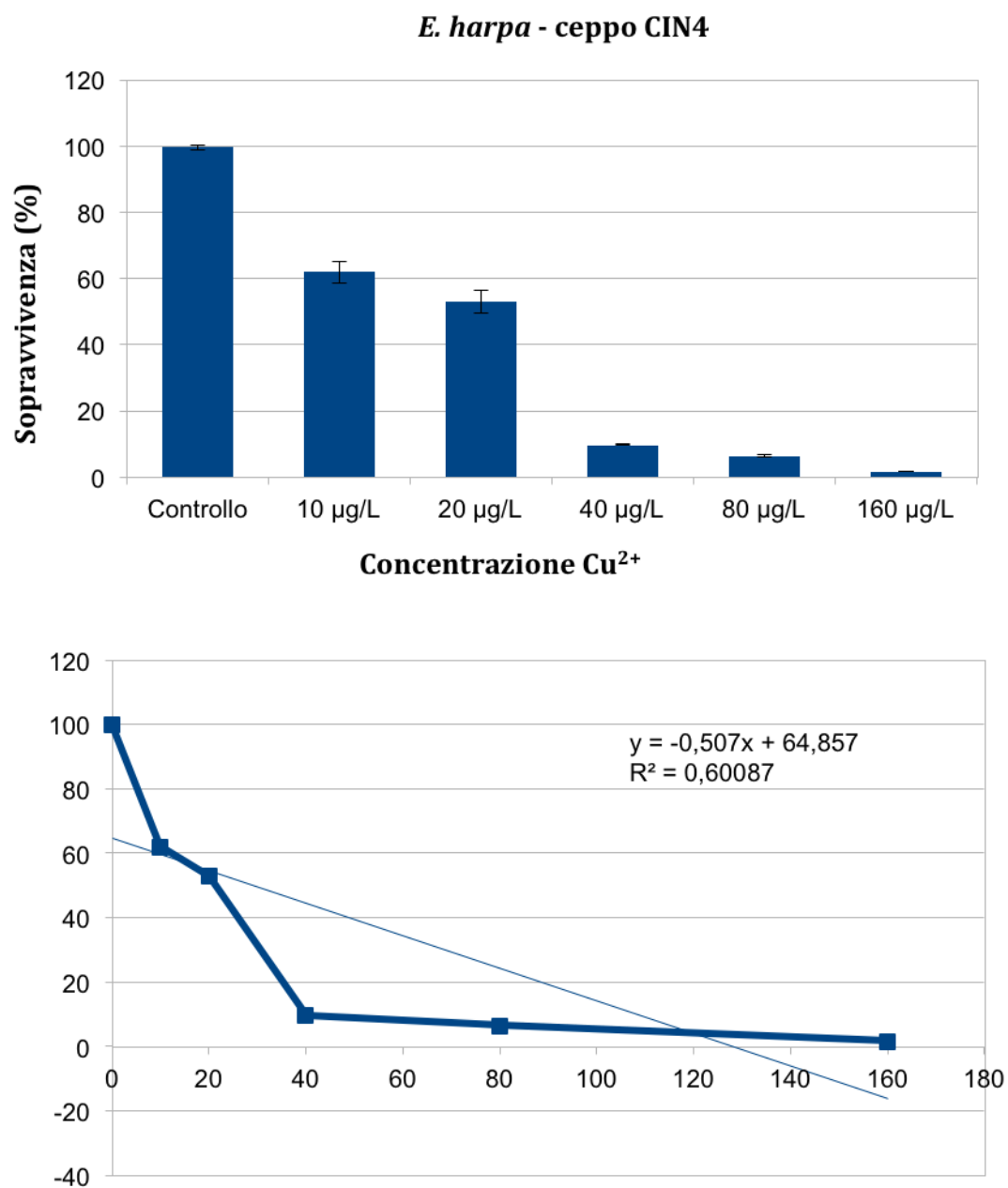


Figura 17. Percentuali di sopravvivenza cellulare alle diverse concentrazioni di Cu^{2+} testate e relativa retta di regressione per il ceppo CIN4 della specie *Euplotes harpa*.

I valori medi (tra le tre repliche sperimentali) della LC₅₀ calcolata in 24 ore nei ceppi analizzati sono riportati in Tabella 15.

Tabella 15. Valori medi di 24-h LC₅₀ calcolati nei ceppi di *Euplotes* analizzati per la tossicità acuta di Cu²⁺.

Specie	Ceppo	24-h LC ₅₀ (µg/L) ± d.s.	C.V. (%)
<i>E. aediculatus</i>	2IP10rK1-2	93,00 ± 2,09	2,24
	RoM8	85,35 ± 1,19	1,39
	SPZ1	71,10 ± 3,90	5,48
<i>E. octocarinatus</i>	27(11)-III	707,36 ± 21,01	2,97
	VTN7	209,07 ± 0,72	0,35
<i>E. harpa</i>	CIN4	29,29 ± 0,86	2,93

Il valore più elevato di 24-h LC₅₀ (93,00 µg/L) è stato riscontrato nel ceppo 27(11)-III di *E. octocarinatus*, mentre il valore più basso (29,29 µg/L) si osservava nel ceppo di *E. harpa*.

Tra i ceppi di *E. aediculatus* analizzati, quello più resistente a Cu²⁺ è risultato il ceppo 2IP10rK1-2 (con il più elevato valore di 24-h LC₅₀, pari a 93,00 µg/L), mentre quello più sensibile è risultato il ceppo SPZ1 (con un valore di 24-h LC₅₀ di 71,10 µg/L).

Sebbene i tre ceppi di *E. aediculatus* analizzati abbiano mostrato una risposta simile al metallo in esame, tale omogeneità non è stata riscontrata, invece, nel caso della specie *E. octocarinatus*, in cui i due ceppi analizzati hanno mostrato valori di 24-h LC₅₀ diversi tra di loro per più di un fattore 3.

I valori medi (tra i vari ceppi) della LC₅₀, calcolata in 24 ore nelle specie di *Euplotes* in cui sono stati analizzati più di un ceppo (*E. aediculatus*, *E. octocarinatus*) sono mostrati in Tabella 16.

Tabella 16. Valori medi di 24-h LC₅₀ calcolati nelle specie di *Euplotes* analizzate per la tossicità acuta di Cu²⁺.

Specie	24-h LC ₅₀ (µg/L) ± d.s.	C.V. (%)
<i>E. aediculatus</i>	85,15 ± 11,12	13,37
<i>E. octocarinatus</i>	458,21 ± 352,34	76,89

L'elevato valore di Coefficiente di Variazione (C.V.) ottenuto per la specie *E. octocarinatus* (76,89 %) è indice della notevole variabilità intra-specifica osservata in questa specie nella risposta dei vari ceppi al metallo in esame.

Dall'ispezione delle medie delle 24-h LC₅₀ calcolate nelle tre specie, si evince che la resistenza al rame è differente. La specie meno resistente è *E. harpa*, con una 24-h LC₅₀ di 29,29 µg/L; quella con caratteristiche intermedie è *E. aediculatus*, con una 24-h LC₅₀ di 85,15 µg/L e la più resistente è *E. octocarinatus*, con valori che arrivano a 458,21 µg/L. La specie *E. octocarinatus* è più resistente di *E. harpa* di un fattore 15,64 e di *E. aediculatus* di un fattore 5,38. La specie *E. aediculatus* è più resistente di *E. harpa* di un fattore pari a 2,91.

L'analisi statistica dei dati ottenuti nei ceppi analizzati di *E. aediculatus*, eseguita utilizzando un'analisi parametrica ANOVA ad una via e un'analisi non-parametrica di Kruskal-Wallis, è mostrata in Tabella 17. La statistica F calcolata con ANOVA a una via è superiore al valore critico (riportato in tabella come F_(2,6)). La statistica H calcolata con Kruskal-Wallis è superiore al valore critico (riportato in tabella come H_c). I risultati ottenuti con l'analisi parametrica ANOVA a una via è stata confermata dall'analisi non-parametrica

di Kruskal-Wallis.

L'analisi statistica dei dati ottenuti con i ceppi di *E. octocarinatus*, eseguita con un test t-Student per campioni indipendenti, è mostrata in Tabella 18. La statistica t calcolata è maggiore del valore critico (riportato in tabella come T_c).

Tutti i risultati indicano che le differenze osservate nei valori di 24-h LC_{50} nei ceppi di entrambe le specie sono statisticamente significative.

Tabella 17. Analisi statistica eseguita sui valori di 24-h LC_{50} ottenuti nei ceppi di *E. octocarinatus* per la tossicità acuta di Cu^{2+} .

	ANOVA a una via			Kruskal-Wallis		
	Tra gruppi	Entro gruppi	Totale	H	Gdl	H_c
<i>E. aediculatus</i>						
SS	741,79	41,97	783,75	7,20	2,00	5,60
MS	370,89	6,99				
Gdl	2,00	6,00	8,00			
F	53,02					
$F_{(2,6)}$	5,14					

SS: Devianza, calcolata tra gruppi ed entro gruppi

MS: Varianza, calcolata tra gruppi ed entro gruppi

Gdl: gradi di libertà

F: Statistica di ANOVA

$F_{(2,6)}$: Valore F critico per 2 e 6 gradi di libertà e per $\alpha < 0,05$.

H: Statistica del test di Kruskal-Wallis

H_c : Valore critico tabulato per 2 gradi di libertà e per $\alpha < 0,05$.

Tabella 18. Analisi statistica t-Student eseguita sui valori di 24-h LC_{50} ottenuti nei ceppi di *E. octocarinatus* per la tossicità acuta di Cu^{2+} .

<i>E. octocarinatus</i>	
Test t	2,566
Gdl	4,000
T_c	2,132

Test t: statistica del t-Student

Gdl: gradi di libertà

T_c : valore di t critico per 2 gradi di libertà e per $\alpha < 0,05$.

3.2.4. Saggio di bio-accumulo

In Tabella 19 sono mostrati i risultati relativi alla capacità di accumulo dello ione Cu^{2+} da parte delle specie di *Euplotes* analizzate, prendendo in considerazione il ceppo che mostrava il maggiore valore di 24-h LC_{50} , così come determinato nella valutazione della tossicità acuta.

Tabella 19. Valori medi di bio-accumulo dello ione metallico Cu^{2+} in *E. octocarinatus*.

Specie	Ceppo	Colture	CMI ($\mu\text{g/L}$)	CMF ($\mu\text{g/L}$)	CMR ($\mu\text{g/L}$)	B (%)
<i>E. octocarinatus</i>	27(11)-III	T	700,00	688,67	11,33	
		C-	700,00	696,91	3,09	1,17
		C+	700,00	699,56	0,44	

T. Colture cellulari trattate con una concentrazione di Cu^{2+} pari alla 24-h LC_{50} (con ione metallico e ciliati).

C-. Controllo negativo (senza ione metallico, ma con ciliati).

C+. Controllo positivo (con ione metallico, ma senza ciliati).

CMI. Concentrazione di metallo iniziale.

CMF. Concentrazione di metallo finale (dopo 24 ore di trattamento).

CMR. Concentrazione di metallo rimossa dalle cellule.

B. Percentuale stimata di bio-accumulo dello ione metallico.

Come si può osservare in Tabella 20, la specie analizzata presenta valori di percentuale di bio-accumulo (B) dello ione Cu^{2+} molto bassi (1,17%). Inoltre, il livello di Cu^{2+} riscontrato nel controllo negativo (C-) (3,09 $\mu\text{g/L}$) indica che una certa quantità di ioni metallici Cu^{2+} è costitutivamente presente nelle cellule.

3.3. METALLO PESANTE: Cr⁶⁺

3.3.1. Saggio del terreno di coltura

Come fonte dello ione Cr⁶⁺ era utilizzata la soluzione di K₂Cr₂O₇. I risultati del saggio del terreno di coltura, effettuato per valutare se lo ione metallico presente nella soluzione utilizzata fosse chelato da uno o più reagenti del terreno di coltura S.M.C., sono riportati in Tabella 20.

Tabella 20: Concentrazioni di ioni Cr⁶⁺ testate in acqua bidistillata e in terreno di coltura S.M.C., dopo 24 ore dalla loro preparazione.

Concentrazione Cr ⁶⁺ testate (mg/L)	Concentrazione Cr ⁶⁺ in acqua bidistillata (mg/L)*	Concentrazione Cr ⁶⁺ in S.M.C. (mg/L)*
0,5	0,493	0,485
1,0	1,020	1,006
3,0	3,038	3,02

*. Misurata dopo 24 ore dalla preparazione.

Come si può osservare, i risultati ottenuti indicano che non c'è alcun effetto apprezzabile di chelazione dello ione metallico da parte del terreno di coltura utilizzato per la crescita dei protisti ciliati.

3.3.2. Selezione delle concentrazioni di metallo pesante

Per ogni ceppo sono state individuate le concentrazioni di ione metallico che provocavano la morte di almeno il 50% degli individui in inoculi di 1 mL alla concentrazione di circa 1300 cellule/mL (Tabella 21). Tali concentrazioni, a loro volta, sono state utilizzate per selezionare una serie di cinque diverse concentrazioni di metallo (Tab. 22), da utilizzare negli esperimenti di tossicità acuta.

Tabella 21. Mortalità delle specie di *Euplotes* analizzate alle diverse concentrazioni di Cr⁶⁺ testate.

Specie	Ceppo	Concentrazione Cr⁶⁺ testate (µg/L)	Mortalità (%)*
<i>E. aediculatus</i>			
	2IP10rK1-2	0 (controllo)	90
		7,8	75
		15,6	70
		31,2	65
		62,5	45
		125,0	30
	RoM8	0 (controllo)	90
		7,8	80
		15,6	75
		31,2	70
		62,5	45
		125,0	30
	SPZ1	0 (controllo)	100
		7,8	65
		15,6	45
		31,2	40
		62,5	30
		125,0	15
<i>E. octocarinatus</i>			
	27(11)-III	0 (controllo)	100
		5,3	95
		8,0	90
		12,0	80
		18,0	50
		27,0	40

Specie	Ceppo	Concentrazione Cr⁶⁺ testate (µg/L)	Mortalità (%)*
<i>E. octocarinatus</i>			
	VTN7	0 (controllo)	90
		5,3	85
		8,0	82
		12,0	80
		18,0	50
		27,0	40
<i>E. harpa</i>			
	CIN4	0 (controllo)	90
		7,8	75
		15,6	72
		31,2	60
		62,5	45
		125,0	40

*. Valutata dopo 24 ore dalla somministrazione dello ione metallico.

Tabella 22. Concentrazioni di ioni Cr⁶⁺ selezionate, da utilizzare negli esperimenti di tossicità acuta.

Specie	Ceppo	Concentrazioni Cr⁶⁺ selezionate (µg/L)
<i>E. aediculatus</i>		
	2IP10rK1-2	7,8 15,6 31,2 62,5 125
	RoM8	7,8 15,6 31,2 62,5 125
	SPZ1	7,8 15,6 31,2 62,5 125
<i>E. octocarinatus</i>		
	27(11)-III	5,3 8 12 18 27
	VTN7	5,3 8 12 18 27
<i>E. harpa</i>		
	CIN4	7,8 15,6 31,2 62,5 125

3.3.3. Valutazione della tossicità acuta

Le percentuali di sopravvivenza in funzione delle concentrazioni di Cr^{6+} somministrate, con le relative deviazioni standard, sono riportate, per ogni ceppo e specie analizzati, nei grafici (Figg. 18 - 23). Per ogni grafico sono mostrati la relativa retta di regressione lineare ed il coefficiente R^2 calcolati.

E. aediculatus -ceppo 2IP10rK1-2

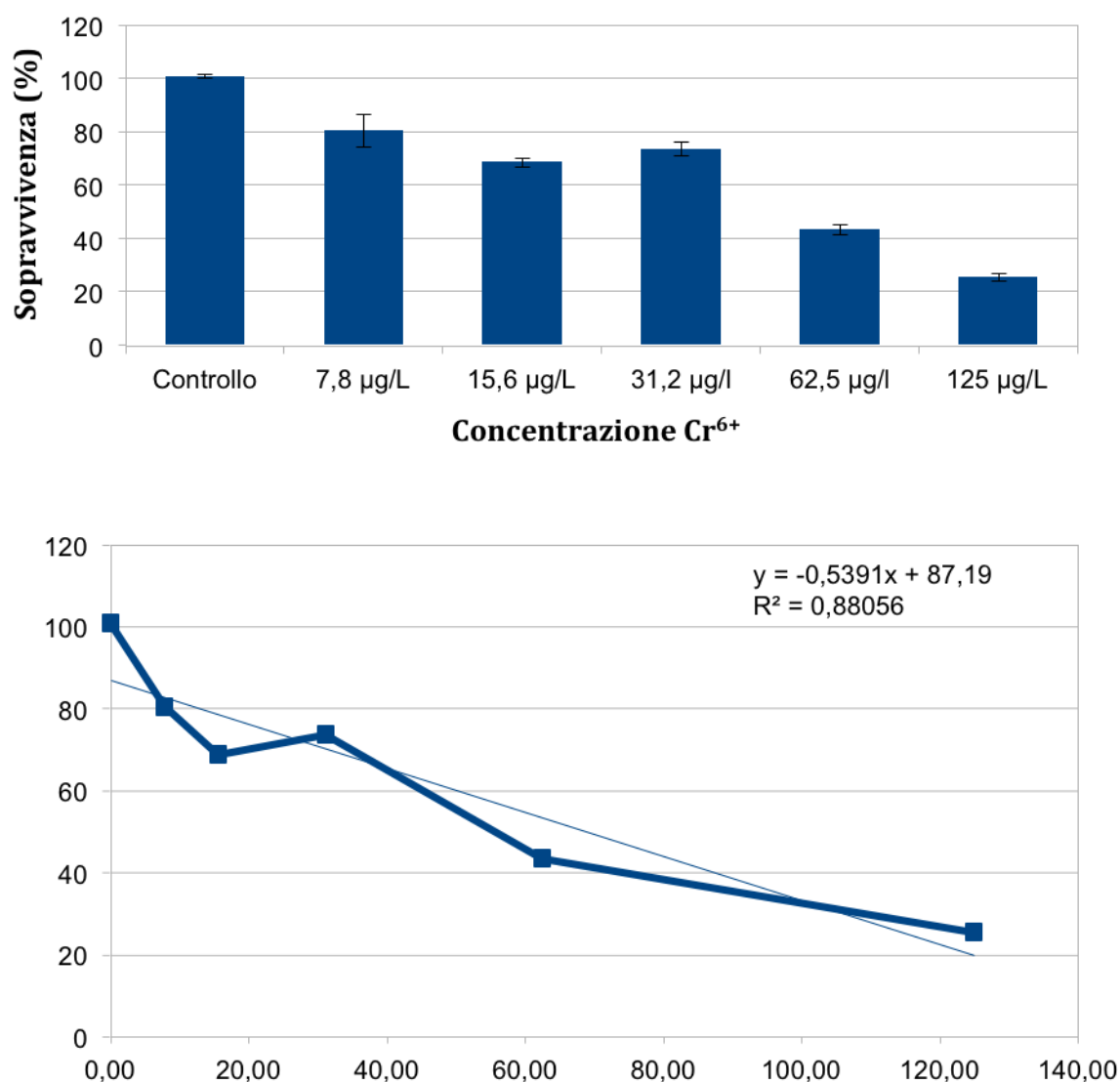


Figura 18. Percentuali di sopravvivenza cellulare alle diverse concentrazioni di Cr^{6+} testate e relativa retta di regressione per il ceppo 2IP10rK1-2 della specie *Euplotes aediculatus*.

***E. aediculatus* - ceppo RoM8**

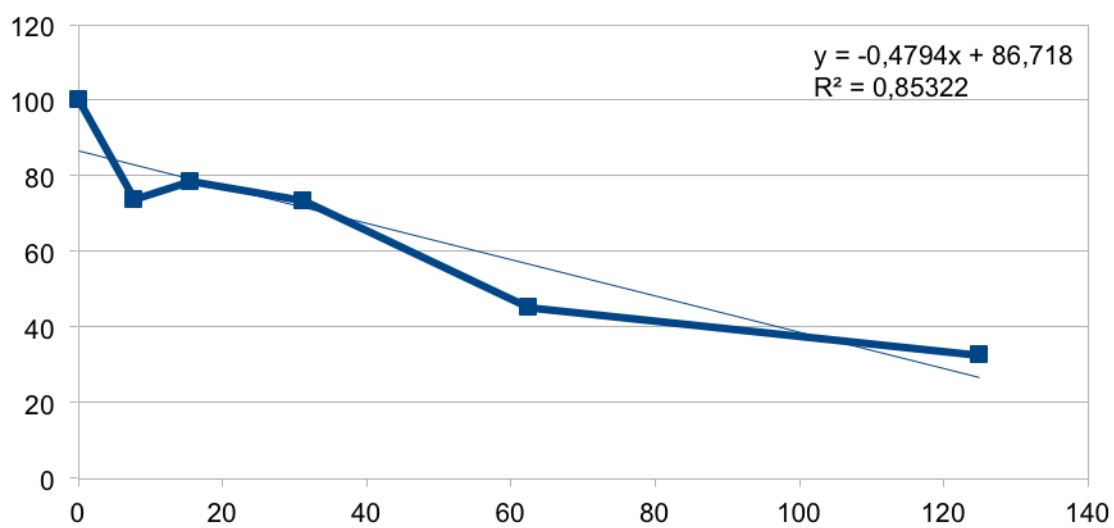
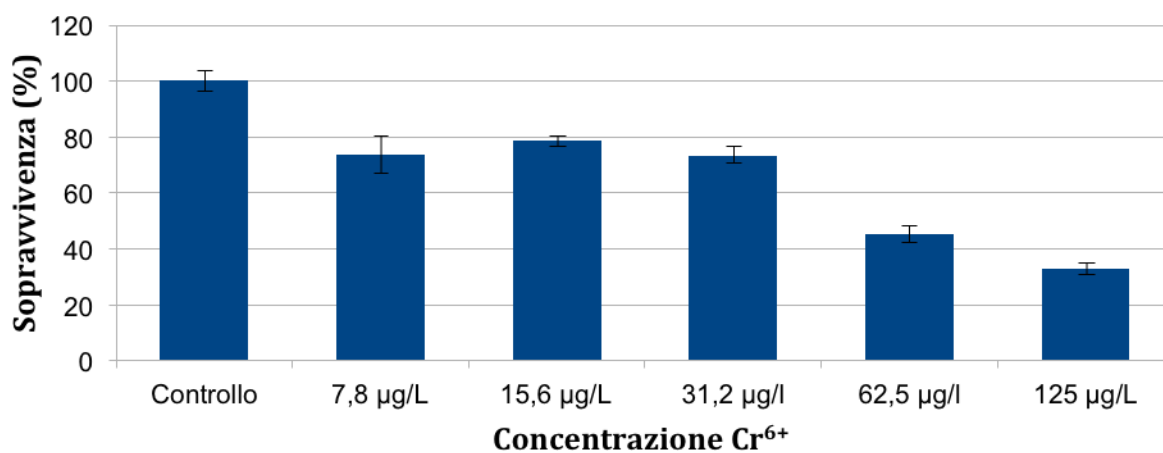


Figura 19. Percentuali di sopravvivenza cellulare alle diverse concentrazioni di Cr⁶⁺ testate e relativa retta di regressione per il ceppo RoM8 della specie *Euplotes aediculatus*.

***E. aediculatus* - ceppo SPZ1**

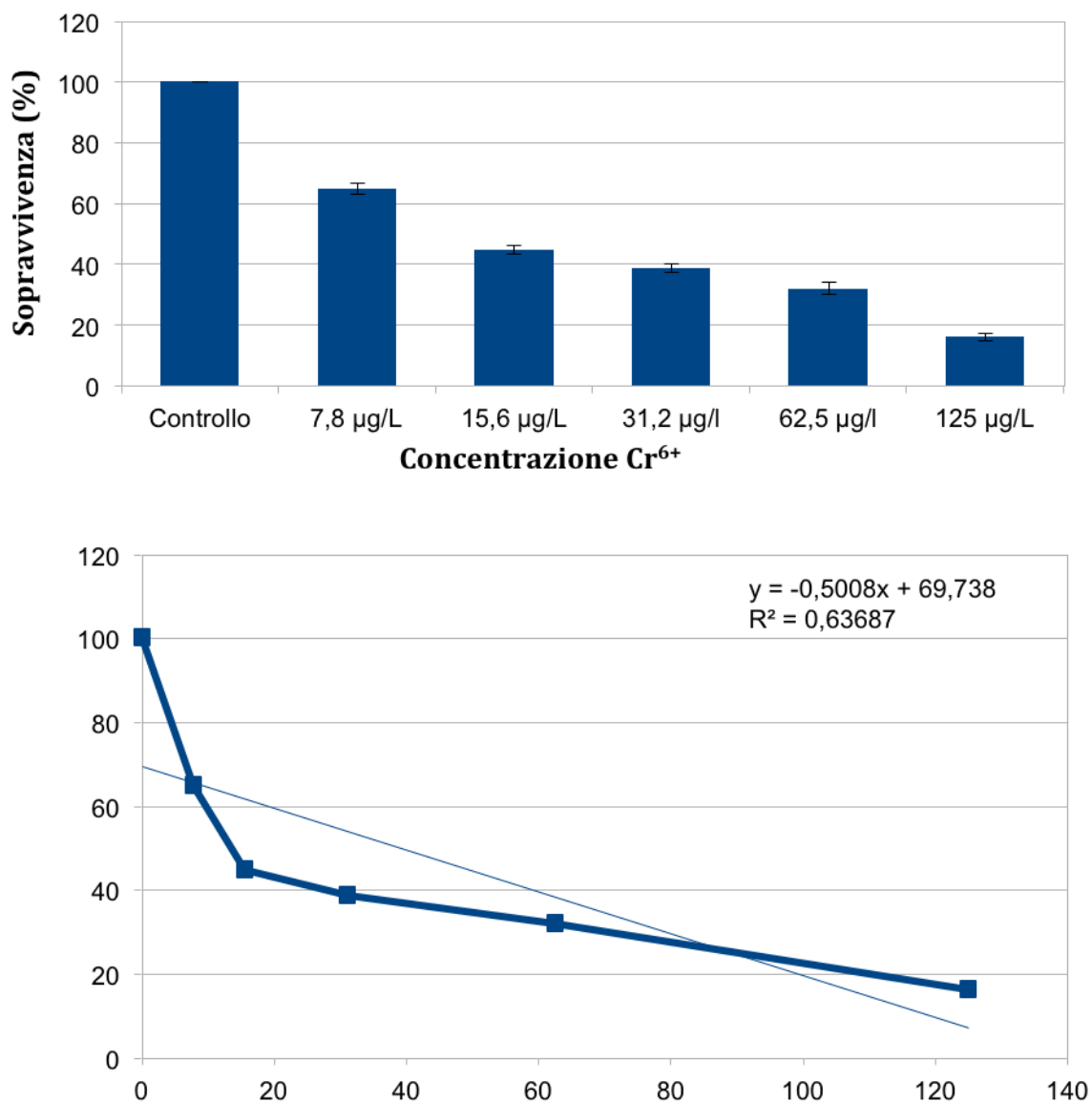


Figura 20. Percentuali di sopravvivenza cellulare alle diverse concentrazioni di Cr⁶⁺ testate e relativa retta di regressione per il ceppo SPZ1 della specie *Euplotes aediculatus*.

***E. octocarinatus* - ceppo 27(11)-III**

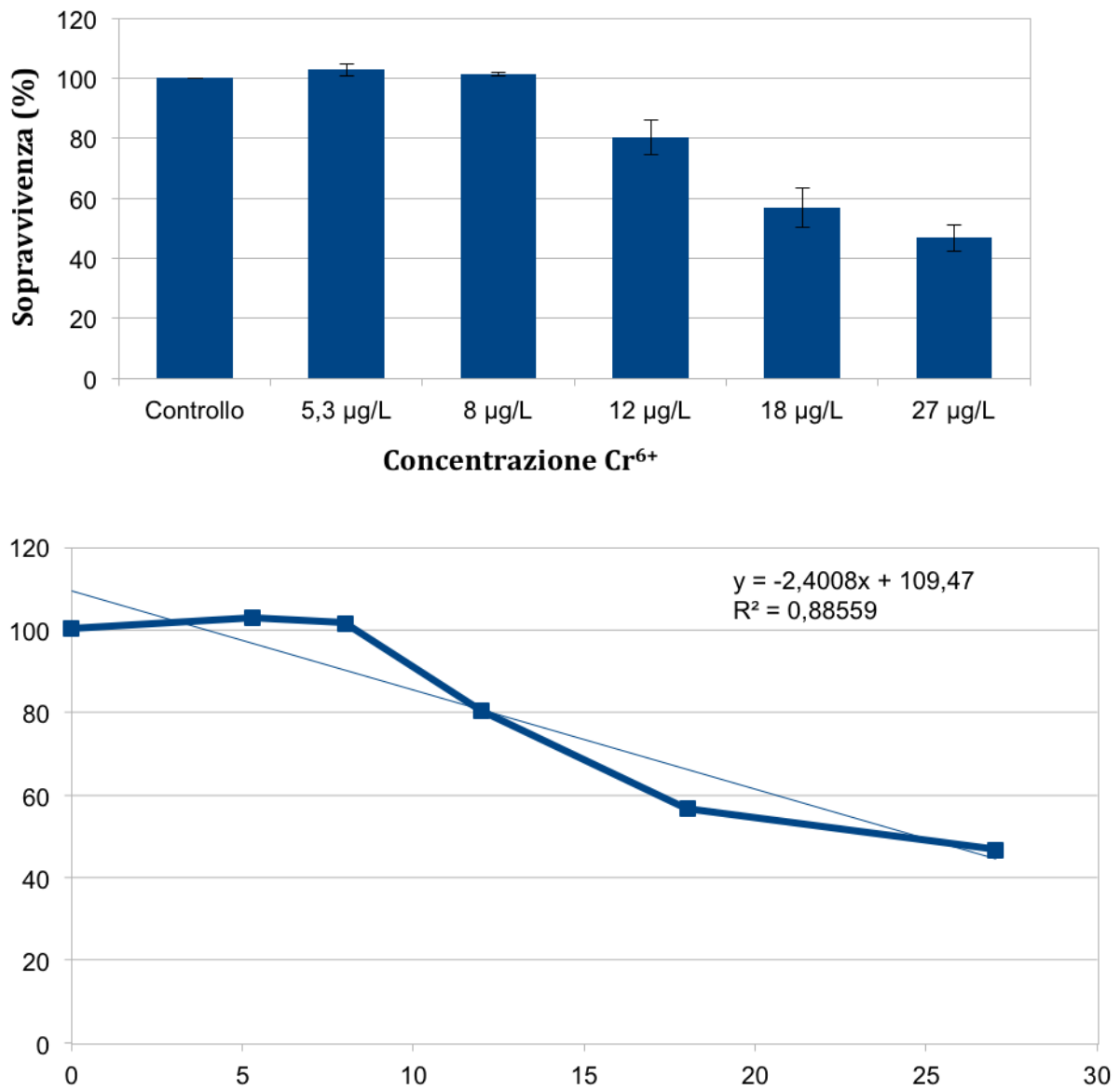


Figura 21. Percentuali di sopravvivenza cellulare alle diverse concentrazioni di Cr⁶⁺ testate e relativa retta di regressione per il ceppo 27(11)-III della specie *Euplotes octocarinatus*.

***E. octocarinatus* - ceppo VTN7**

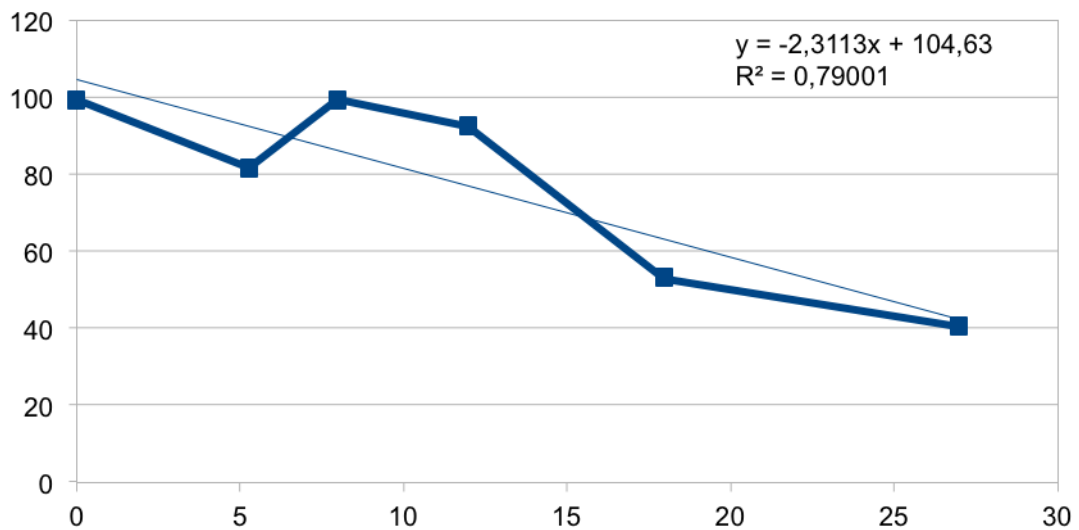
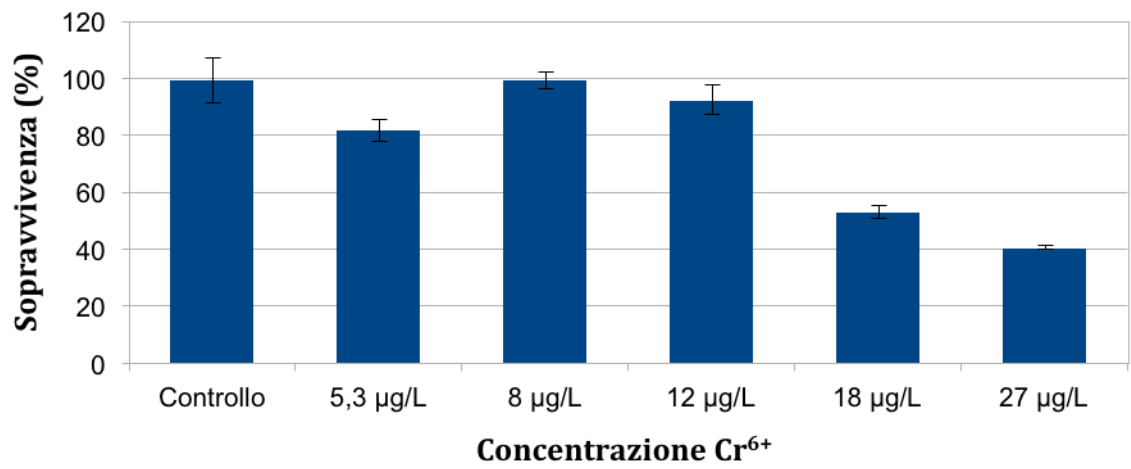


Figura 22. Percentuali di sopravvivenza cellulare alle diverse concentrazioni di Cr⁶⁺ testate e relativa retta di regressione per il ceppo VTN7 della specie *Euplotes octocarinatus*.

***E. harpa* - ceppo CIN4**

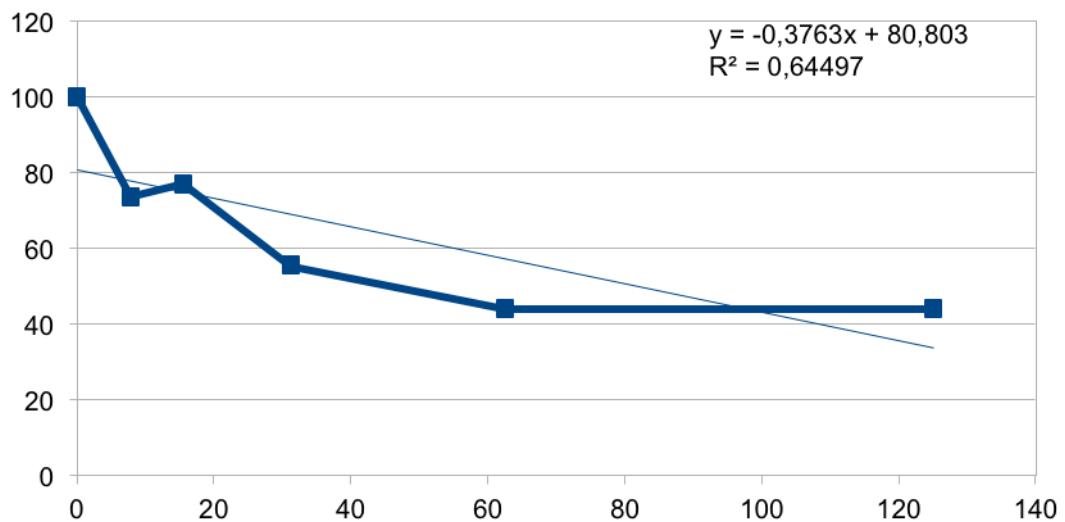
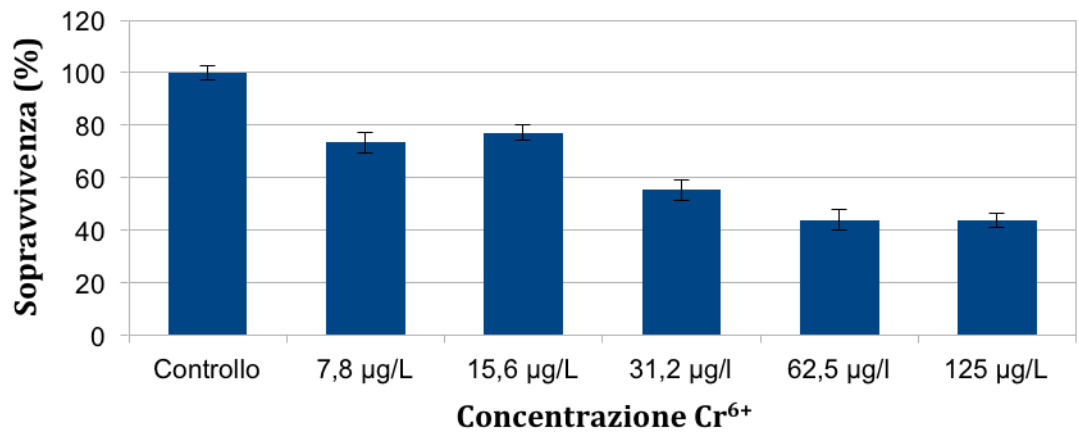


Figura 23. Percentuali di sopravvivenza cellulare alle diverse concentrazioni di Cr⁶⁺ testate e relativa retta di regressione per il ceppo CIN4 della specie *Euplotes harpa*.

I valori medi (tra le tre repliche sperimentali) della LC₅₀ calcolata in 24 ore nei ceppi analizzati sono riportati in Tabella 23.

Tabella 23. Valori medi di 24-h LC₅₀ calcolati nei ceppi di *Euplotes* analizzati per la tossicità acuta di Cr⁶⁺.

Specie	Ceppo	24-h LC ₅₀ (µg/L) ± d.s.	C.V. (%)
<i>E. aediculatus</i>	2IP10rK1-2	64,94 ± 3,73	5,75
	RoM8	74,72 ± 3,21	4,30
	SPZ1	39,41 ± 0,79	2,01
<i>E. octocarinatus</i>	27(11)-III	24,89 ± 2,10	8,44
	VTN7	25,30 ± 1,27	5,02
<i>E. harpa</i>	CIN4	80,98 ± 3,63	4,48

Il valore più elevato di 24-h LC₅₀ (80,98 µg/L) è stato riscontrato nel ceppo CIN4 di *E. harpa*, mentre il valore più basso (24,89 µg/L) si osservava nel ceppo 27(11)-III di *E. octocarinatus*.

Tra i ceppi di *E. aediculatus* analizzati, quello più resistente al cromo è risultato il ceppo RoM8 (con il più elevato valore di 24-h LC₅₀, pari a 74,72 µg/L), mentre quello più sensibile è risultato il ceppo SPZ1 (con un valore di 24-h LC₅₀ di 39,41 µg/L).

Sebbene i due ceppi di *E. octocarinatus* analizzati abbiano mostrato una risposta simile al metallo in esame, tale omogeneità non è stata riscontrata, invece, nel caso della specie *E. aediculatus*, in cui i tre ceppi analizzati hanno mostrato valori di 24-h LC₅₀ diversi tra di loro per un fattore di 1,9 tra RoM8 e SPZ1, di 1,1 tra RoM8 e 2IP10rK1-2 e di 1,6 tra 2IP10rK1-2 e SPZ1.

I valori medi (tra i vari ceppi) della LC₅₀, calcolata in 24 ore nelle specie di *Euplotes* in cui sono stati analizzati più di un ceppo (*E. aediculatus*, *E. octocarinatus*) sono mostrati in Tabella 24.

Tabella 24. Valori medi di 24-h LC₅₀ calcolati nelle specie di *Euplotes* analizzate per la tossicità acuta di Cr⁶⁺.

Specie	24-h LC ₅₀ (µg/L) ± d.s.	C.V. (%)
<i>E. aediculatus</i>	59,36 ± 18,09	30,49
<i>E. octocarinatus</i>	25,09 ± 0,29	1,15

L'elevato valore di Coefficiente di Variazione (C.V.) ottenuto per la specie *E. aediculatus* (30,49 %) è indice della variabilità intra-specifica osservata in questa specie nella risposta dei vari ceppi al metallo in esame.

Dall'ispezione delle medie delle 24-h LC₅₀ calcolate nelle tre specie, si evince che la resistenza al cromo è differente. La specie meno resistente è *E. octocarinatus*, con una 24-h LC₅₀ di 25,09 µg/L; quella con caratteristiche intermedie è *E. aediculatus*, con una 24-h LC₅₀ di 59,36 µg/L e la più resistente è *E. harpa*, con valori di 80,98 µg/L. La specie *E. harpa* è più resistente di *E. octocarinatus* di un fattore 3,23 e di *E. aediculatus* di un fattore 1,36. La specie *E. aediculatus* è più resistente al cromo rispetto a *E. octocarinatus* di un fattore pari a 2,36.

L'analisi statistica dei dati ottenuti nei ceppi analizzati di *E. aediculatus*, eseguita utilizzando un'analisi ANOVA ad una via, è mostrata in Tabella 25. La statistica F calcolata è superiore al valore critico (riportato in tabella come $F_{(2,6)}$). La statistica H calcolata con Kruskal-Wallis è superiore al valore critico (riportato in tabella come H_c). I risultati ottenuti con l'analisi parametrica ANOVA a una via è stata confermata dall'analisi non-parametrica di Kruskal-Wallis: le differenze osservate nei valori di 24-h LC_{50} nei ceppi di *E. aediculatus* sono statisticamente significative.

L'analisi statistica dei dati ottenuti con i ceppi di *E. octocarinatus*, eseguita con un test t-Student per campioni indipendenti, è mostrata in Tabella 26. La statistica t calcolata è minore del valore critico (riportato in tabella come T_c). Il risultato indica che non ci sono differenze statisticamente significative nei valori di 24-h LC_{50} calcolati nei ceppi di *E. octocarinatus*.

Tabella 25. Analisi statistica eseguita sui valori di 24-h LC_{50} ottenuti nei ceppi di *E. aediculatus* per la tossicità acuta di Cr^{6+} .

	ANOVA a una via			Kruskal-Wallis		
	Tra gruppi	Entro gruppi	Totale	H	Gdl	H_c
<i>E. aediculatus</i>						
SS	1994,72	49,84	2044,56	7,20	2,00	5,60
MS	997,36	8,31				
Gdl	2,00	6,00	8,00			
F	120,07					
$F_{(2,6)}$	5,14					

SS: Devianza, calcolata tra gruppi ed entro gruppi

MS: Varianza, calcolata tra gruppi ed entro gruppi

Gdl: gradi di libertà

F: Statistica di ANOVA

$F_{(2,6)}$: Valore F critico per 2 e 6 gradi di libertà e per $\alpha < 0,05$.

H: Statistica del test di Kruskal-Wallis

H_c : Valore critico tabulato per 2 gradi di libertà e per $\alpha < 0,05$.

Tabella 26. Analisi statistica t-Student eseguita sui valori di 24-h LC_{50} ottenuti nei ceppi di *E. octocarinatus* per la tossicità acuta di Cr^{6+} .

<i>E. octocarinatus</i>	
Test t	0,294
Gdl	4,000
T_c	2,132

Test t: statistica di t-Student

Gdl: gradi di libertà

T_c : valore di t critico per 2 gradi di libertà e per $\alpha < 0,05$.

Dalle osservazioni al microscopio ottico è stato riscontrato che a tutte le concentrazioni testate di Cr, tutti i ceppi e le specie in analisi avevano una locomozione differente rispetto al controllo: i ciliati trattati con Cr si muovevano più lentamente ed esploravano il mezzo cambiando più spesso di direzione rispetto al controllo.

3.3.4. Saggio di bio-accumulo

In Tabella 27 sono mostrati i risultati relativi alla capacità di accumulo dello ione Cr^{6+} da parte delle specie di *Euplotes* analizzate, prendendo in considerazione il ceppo che mostrava il maggiore valore di LC_{50} , così come determinato nella valutazione della tossicità acuta.

Tabella 27. Valori medi di bio-accumulo dello ione metallico Cr^{6+} in *E. harpa*.

Specie	Ceppo	Culture	CMI ($\mu\text{g/L}$)	CMF ($\mu\text{g/L}$)	CMR ($\mu\text{g/L}$)	B (%)
<i>E. harpa</i>	CIN4	T	80,00	79,93	0,07	
		C-	80,00	79,92	0,08	0,00
		C+	80,00	79,96	0,04	

T. Culture cellulari trattate con una concentrazione di Cu^{2+} pari alla 24-h LC_{50} (con ione metallico e ciliati).

C-. Controllo negativo (senza ione metallico, ma con ciliati).

C+. Controllo positivo (con ione metallico, ma senza ciliati).

CMI. Concentrazione di metallo iniziale.

CMF. Concentrazione di metallo finale (dopo 24 ore di trattamento).

CMR. Concentrazione di metallo rimossa dalle cellule.

B. Percentuale stimata di bio-accumulo dello ione metallico.

Come si può osservare nella Tabella 27, la quantità di Cr^{6+} misurata nel controllo negativo (C-) è paragonabile a quella presente nel pellet cellulare delle colture trattate con lo ione metallico (T) (0,08 mg/L e 0,07 $\mu\text{g/L}$, rispettivamente), indicando che non vi è stato accumulo di ione metallico.

3.4. METALLO PESANTE: Cd²⁺

3.4.1. Saggio del terreno di coltura

Come fonte dello ione Cd²⁺ era utilizzata la soluzione CdCl₂. I risultati del saggio del terreno di coltura, effettuato per valutare se lo ione metallico presente nella soluzione utilizzata fosse chelato da uno o più reagenti del terreno di coltura S.M.C., sono riportati in Tabella 28.

Tabella 28. Concentrazioni di ioni Cd²⁺ testate in acqua bidistillata e in terreno di coltura S.M.C., dopo 24 ore dalla loro preparazione.

Concentrazione Cd ²⁺ testate (mg/L)	Concentrazione Cd ²⁺ in acqua bidistillata (mg/L)*	Concentrazione Cd ²⁺ in S.M.C. (mg/L)*
0,5	0,487	0,520
1,0	1,020	1,040
3,0	3,005	2,890

*. Misurata dopo 24 ore dalla preparazione.

Come si può osservare, i risultati ottenuti indicano che non c'è alcun effetto apprezzabile di chelazione dello ione metallico da parte del terreno di coltura utilizzato per la crescita dei protisti ciliati.

3.4.2. Selezione delle concentrazioni di metallo pesante

Per ogni ceppo sono state individuate le concentrazioni di ione metallico che provocavano la morte di almeno il 50% degli individui in inoculi di 1 mL alla concentrazione di circa 1300 cellule/mL (Tabella 29). Tali concentrazioni, a loro volta, sono state utilizzate per selezionare una serie di cinque diverse concentrazioni di metallo (Tab. 30), da utilizzare negli esperimenti di tossicità acuta.

Tabella 29. Mortalità delle specie di *Euplotes* analizzate alle diverse concentrazioni di Cd²⁺ testate.

Specie	Ceppo	Concentrazione Cd²⁺ testate (µg/L)	Mortalità (%)*
<i>E. aediculatus</i>	2IP10rK1-2	0 (controllo)	100
		3,9	95
		7,8	85
		15,6	80
		31,2	45
		62,5	30
	RoM8	0 (controllo)	100
		7,8	80
		15,6	75
		31,2	72
		62,5	45
		125,0	40
	SPZ1	0 (controllo)	90
		7,8	65
		15,6	60
		31,2	55
		62,5	35
		125,0	20
<i>E. octocarinatus</i>	27(11)-III	0 (controllo)	100
		7,8	82
		15,6	80
		31,2	70
		62,5	45
		125,0	25
	VTN7	0 (controllo)	100
		7,8	95
		15,6	75
		31,2	68
		62,5	40
		125,0	30

Specie	Ceppo	Concentrazione Cd²⁺ testate (µg/L)	Mortalità (%)*
<i>E. harpa</i>			
	CIN4	0 (controllo)	90
		7,8	68
		15,6	65
		31,2	55
		62,5	40
		125,0	30

*. Valutata dopo 24 ore dalla somministrazione dello ione metallico.

Tabella 30. Concentrazioni di ioni Cd²⁺ selezionate, da utilizzare negli esperimenti di tossicità acuta.

Specie	Ceppo	Concentrazioni Cd²⁺ selezionate (µg/L)
<i>E. aediculatus</i>		
	2IP10rK1-2	3,9 7,8 15,6 31,2 62,5
	RoM8	7,8 15,6 31,2 62,5 125,0
	SPZ1	7,8 15,6 31,2 62,5 125,0
<i>E. octocarinatus</i>		
	27(11)-III	5,3 8,0 12,0 18,0 27,0
	VTN7	5,3 8,0 12,0 18,0 27,0
<i>E. harpa</i>		
	CIN4	7,8 15,6 31,2 62,5 125,0

3.4.3. Valutazione della tossicità acuta

Le percentuali di sopravvivenza in funzione delle concentrazioni di Cd^{2+} somministrate, con le relative deviazioni standard, sono riportate, per ogni ceppo e specie analizzati, nei grafici (Figg. 24 – 29). Per ogni grafico sono, inoltre, mostrati la relativa retta di regressione lineare ed il coefficiente R^2 calcolati.

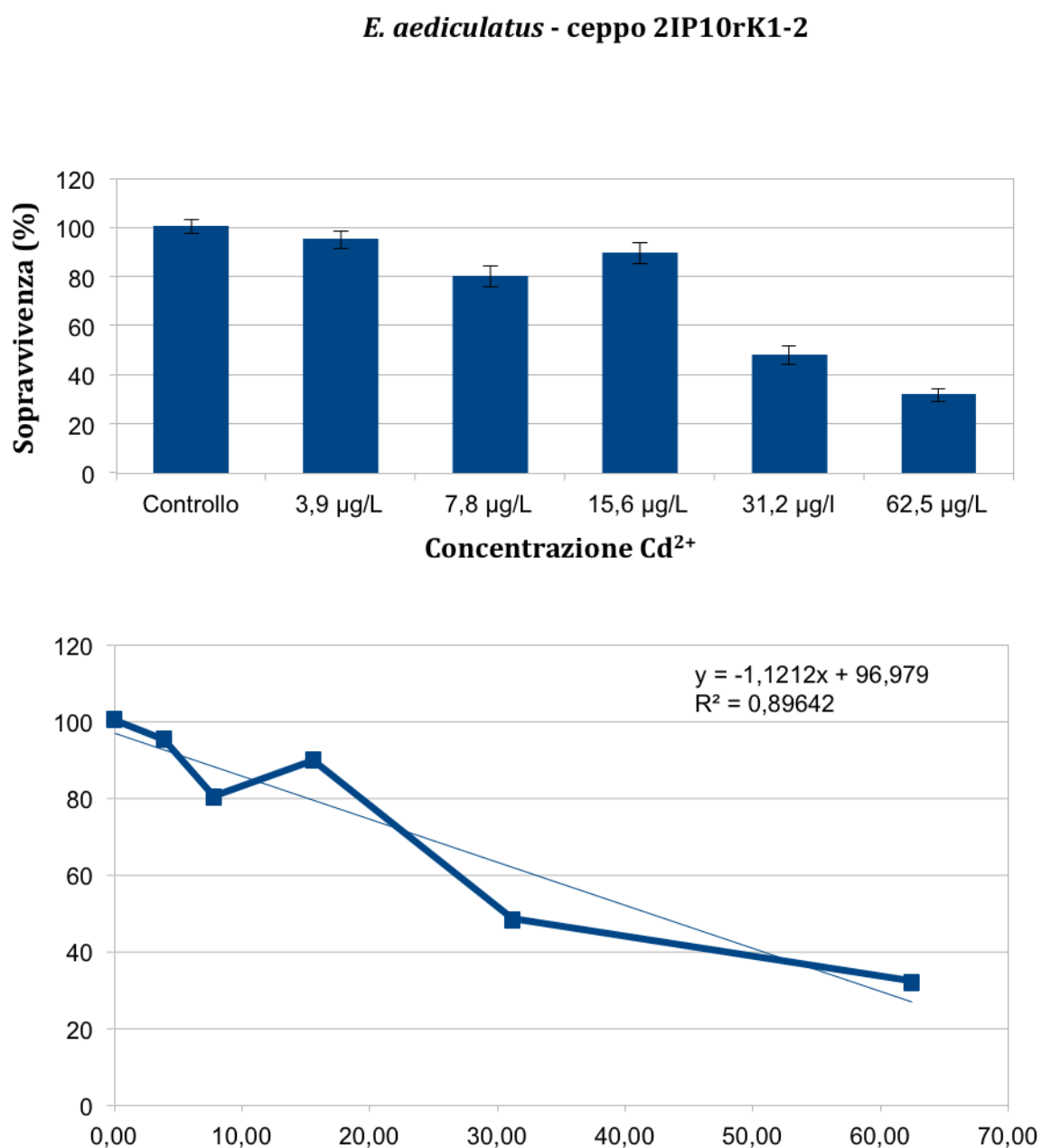


Figura 24. Percentuali di sopravvivenza cellulare alle diverse concentrazioni di Cd^{2+} testate e relativa retta di regressione per il ceppo 2IP10rK1-2 della specie *Euplotes aediculatus*.

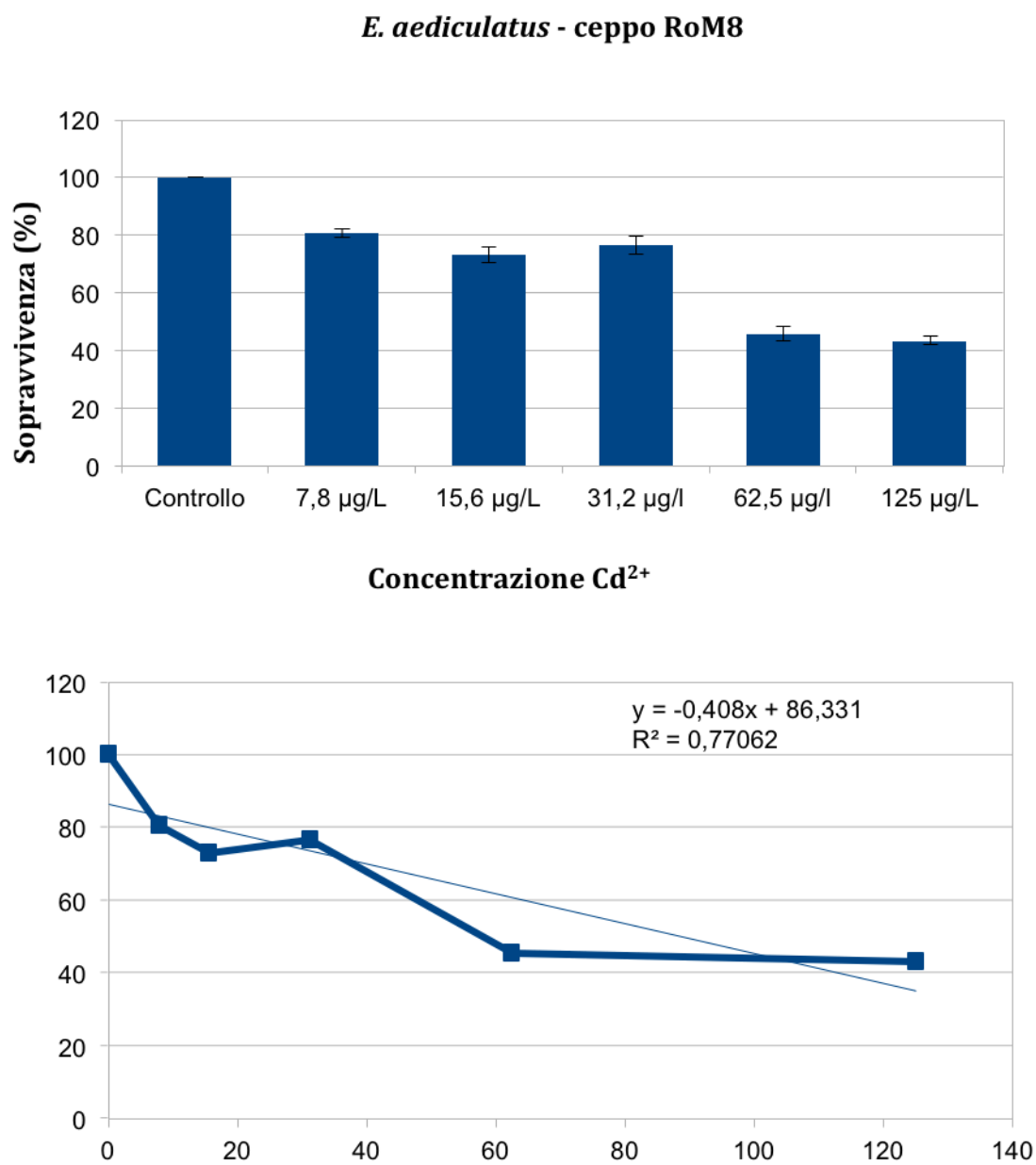


Figura 25. Percentuali di sopravvivenza cellulare alle diverse concentrazioni di Cd²⁺ testate e relativa retta di regressione per il ceppo RoM8 della specie *Euplotes aediculatus*.

***E. aediculatus* - ceppo SPZ1**

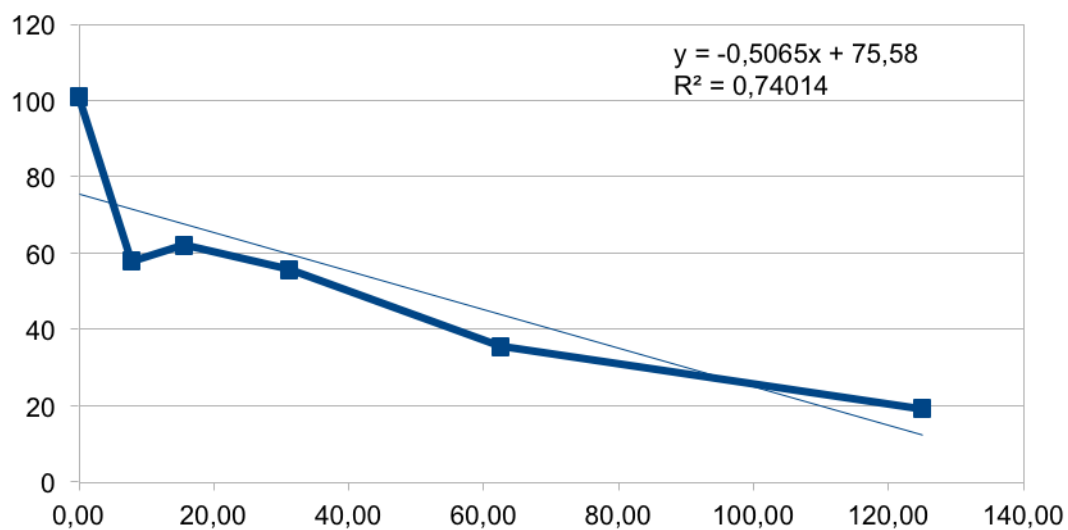
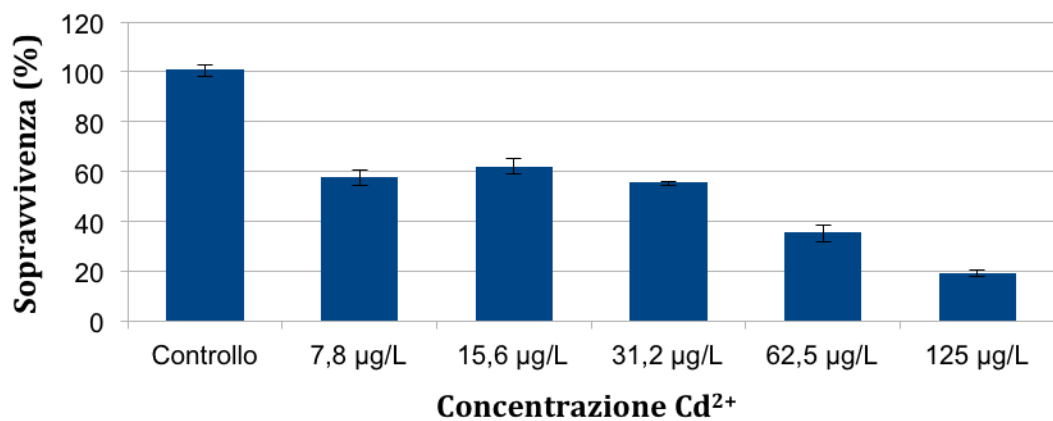


Figura 26. Percentuali di sopravvivenza cellulare alle diverse concentrazioni di Cd²⁺ testate e relativa retta di regressione per il ceppo SPZ1 della specie *Euplotes aediculatus*.

***E. octocarinatus* - ceppo 27(11)-III**

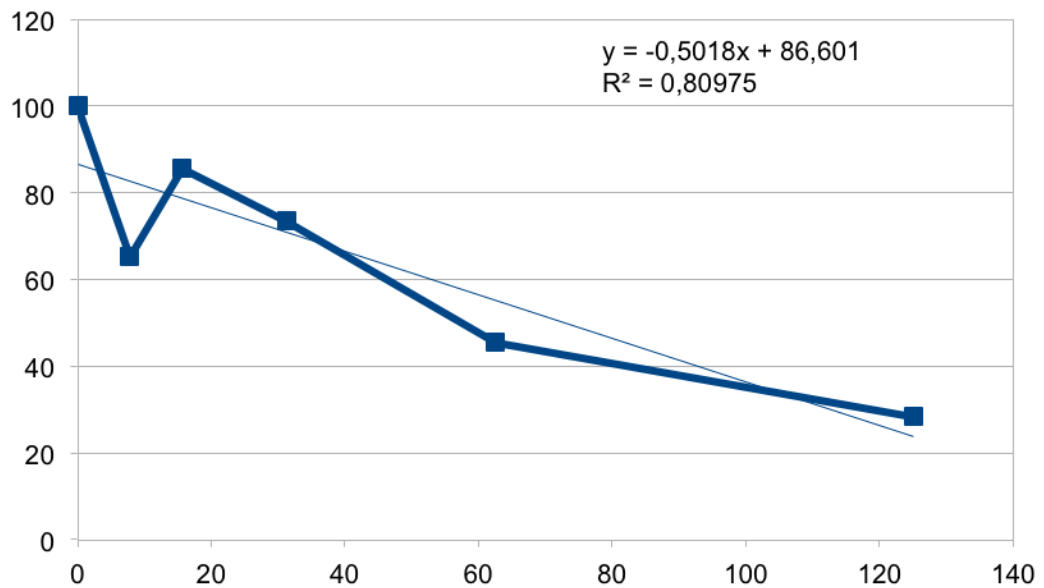
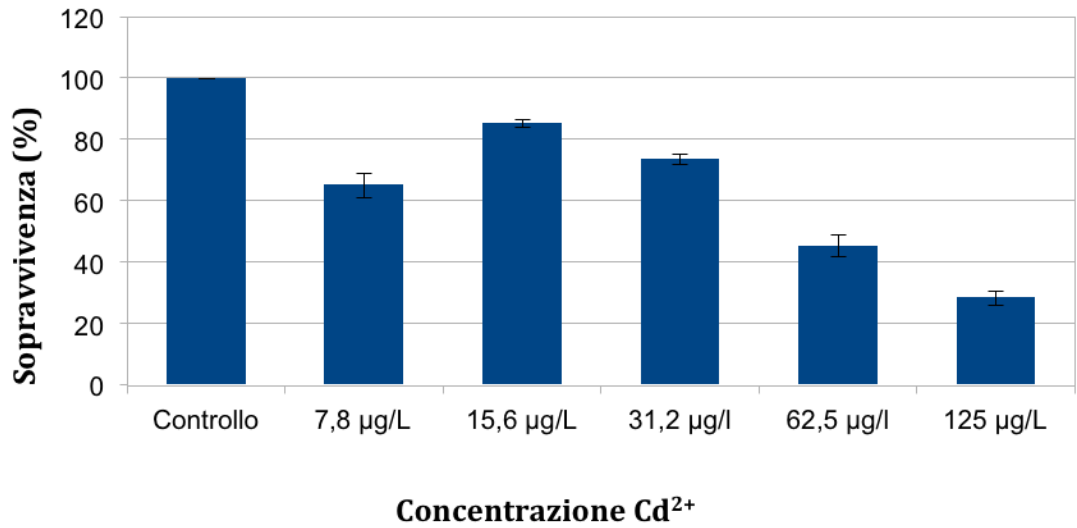


Figura 27. Percentuali di sopravvivenza cellulare alle diverse concentrazioni di Cd²⁺ testate e relativa retta di regressione per il ceppo 27(11)-III della specie *Euplotes octocarinatus*.

***E. octocarinatus* - ceppo VTN7**

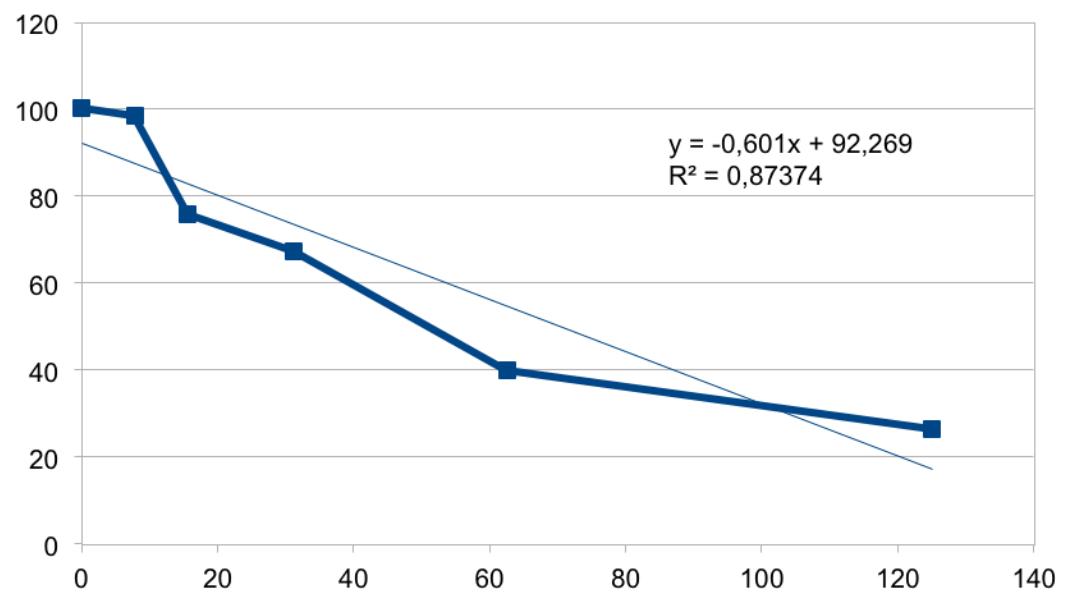
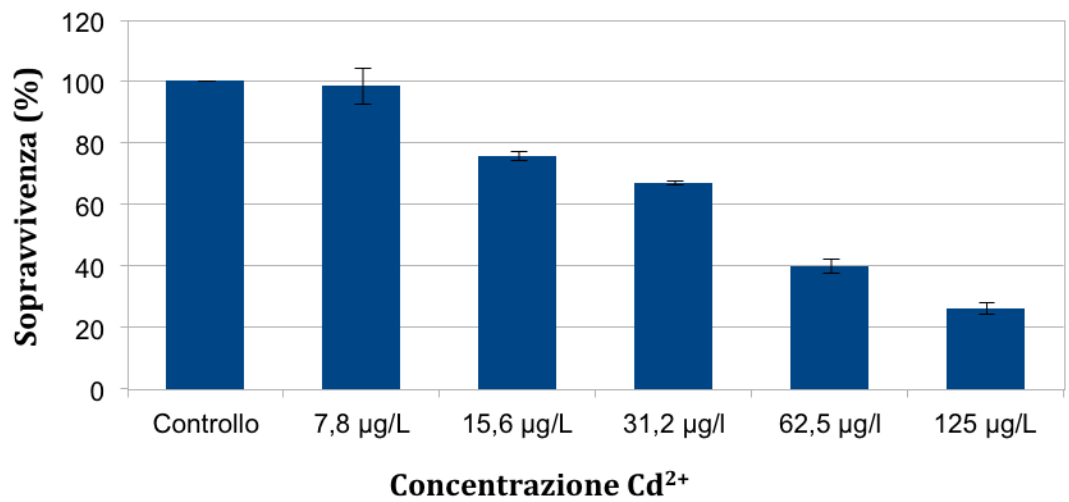


Figura 28. Percentuali di sopravvivenza cellulare alle diverse concentrazioni di Cd^{2+} testate e relativa retta di regressione per il ceppo VTN7 della specie *Euplotes octocarinatus*.

***E. harpa* - ceppo CIN4**

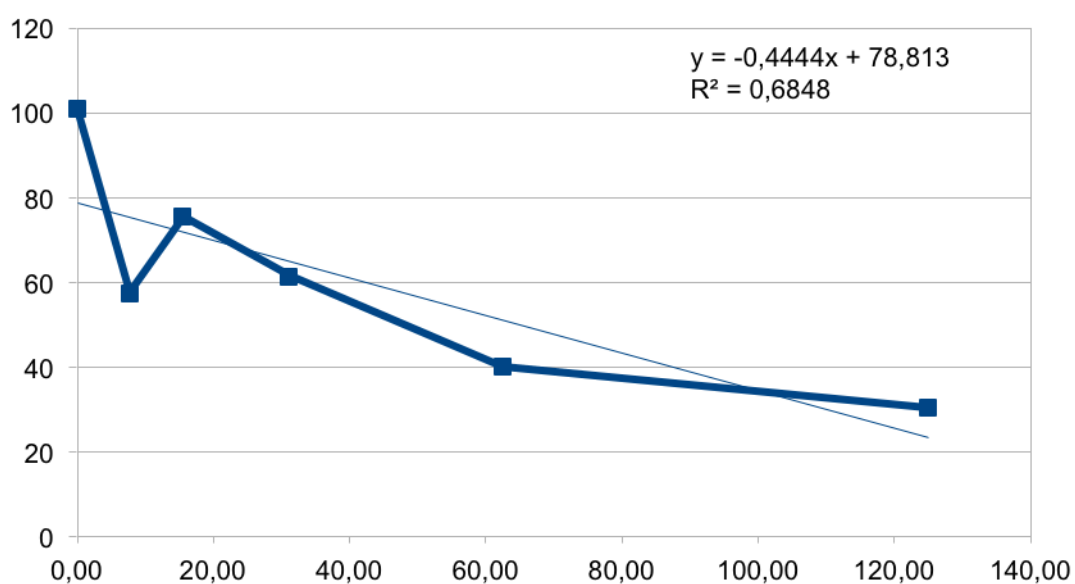
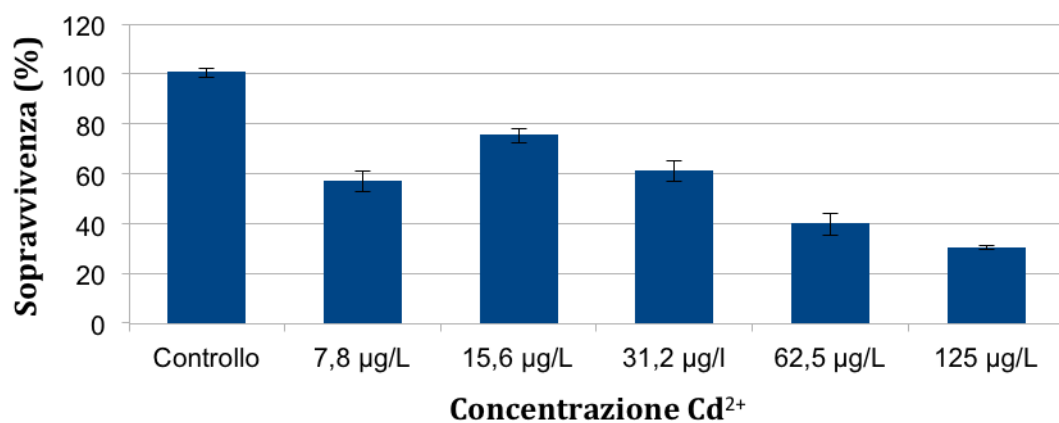


Figura 29. Percentuali di sopravvivenza cellulare alle diverse concentrazioni di Cd²⁺ testate e relativa retta di regressione per il ceppo CIN4 della specie *Euplotes harpa*.

I valori medi (tra le tre repliche sperimentali) della LC₅₀ calcolata in 24 ore nei ceppi analizzati sono riportati in Tabella 31.

Tabella 31. Valori medi di 24-h LC₅₀ calcolati nei ceppi di *Euplotes* analizzati per la tossicità acuta di Cd²⁺.

Specie	Ceppo	24-h LC ₅₀ (µg/L) ± d.s.	C.V. (%)
<i>E. aediculatus</i>	2IP10rK1-2	41,77 ± 2,36	5,65
	RoM8	89,14 ± 3,16	3,55
	SPZ1	37,53 ± 1,01	2,7
<i>E. octocarinatus</i>	27(11)-III	73,01 ± 2,23	3,05
	VTN7	70,32 ± 1,31	1,87
<i>E. harpa</i>	CIN4	57,87 ± 2,18	3,77

Il valore più elevato di 24-h LC₅₀ (89,14 µg/L) è stato riscontrato nel ceppo RoM8 di *E. aediculatus*, mentre il valore più basso (37,53 µg/L) si osservava nel ceppo SPZ1 di *E. aediculatus*.

Tra i ceppi di *E. aediculatus* analizzati, quello più resistente al cadmio è risultato il ceppo RoM8 (con il più elevato valore di 24-h LC₅₀), mentre quello più sensibile è risultato il ceppo SPZ1 (con un valore di 24-h LC₅₀ di 37,53 µg/L).

Sebbene i due ceppi di *E. octocarinatus* analizzati abbiano mostrato una risposta simile al metallo in esame, tale omogeneità non è stata riscontrata, invece, nel caso della specie *E. aediculatus*, in cui i tre ceppi analizzati hanno mostrato valori di 24-h LC₅₀ diversi tra di loro per un fattore di 2,4 tra RoM8 e SPZ1, di 2,1 tra RoM8 e 2IP10rK1-2 e di 1,1 tra 2IP10rK1-2 e SPZ1.

I valori medi (tra i vari ceppi) della LC₅₀, calcolata in 24 ore nelle specie di *Euplotes* in cui sono stati analizzati più di un ceppo (*E. aediculatus*, *E. octocarinatus*) sono mostrati in Tabella 32.

Tabella 32. Valori medi di 24-h LC₅₀ calcolati nelle specie di *Euplotes* analizzate per la tossicità acuta di Cd²⁺.

Specie	24-h LC ₅₀ (µg/L) ± d.s.	C.V. (%)
<i>E. aediculatus</i>	56,15 ± 28,65	51,03
<i>E. octocarinatus</i>	71,66 ± 1,90	2,65

L'elevato valore di Coefficiente di Variazione (C.V.) ottenuto per la specie *E. aediculatus* (51,03 %) è indice della variabilità intra-specifica osservata in questa specie nella risposta dei vari ceppi al metallo in esame.

Dall'ispezione delle medie delle 24-h LC₅₀ calcolati nelle tre specie si evince che la resistenza al cadmio è molto simile tra *E. aediculatus* ed *E. harpa*, mentre entrambe differiscono da *E. octocarinatus*. La specie meno resistente è *E. aediculatus*, con una 24-h LC₅₀ di 56,15 µg/L; la specie *E. harpa*, ha una 24-h LC₅₀ di 57,87 µg/L e la specie più resistente, è *E. octocarinatus*, ha un valore di 71,66 µg/L. La specie *E. octocarinatus* è più resistente di *E. aediculatus* di un fattore di 1,28, mentre di *E. harpa* di un fattore 1,24. *E. harpa* è più resistente al cadmio di *E. harpa* di un solo fattore 1,03.

L'analisi statistica dei dati ottenuti nei ceppi analizzati di *E. aediculatus*, eseguita utilizzando un'analisi ANOVA ad una via, è mostrata in Tabella 33. La statistica F calcolata è superiore al valore critico (riportato in tabella come F_(2,6)). La statistica H calcolata con

Kruskal-Wallis è superiore al valore critico (riportato in tabella come H_c). I risultati ottenuti con l'analisi parametrica ANOVA a una via è stata confermata dall'analisi non-parametrica di Kruskal-Wallis: le differenze osservate nei valori di 24-h LC_{50} nei ceppi di *E. aediculatus* sono statisticamente significative.

L'analisi statistica dei dati ottenuti con i ceppi di *E. octocarinatus*, eseguita con un test t-Student per campioni indipendenti, è mostrata in Tabella 34. La statistica t calcolata è minore del valore critico (riportato in tabella come T_c). Il risultato indica che non ci sono differenze statisticamente significative nei valori di 24-h LC_{50} calcolati nei ceppi di *E. octocarinatus*.

Tabella 33. Analisi statistica eseguita sui valori di 24-h LC_{50} ottenuti nei ceppi di *E. aediculatus* per la tossicità acuta di Cd^{2+} .

	ANOVA a una via			Kruskal-Wallis		
	Tra gruppi	Entro gruppi	Totale	H	Gdl	H_c
<i>E. aediculatus</i>						
SS	4925,11	33,21	49583,3	7,2	2	5,6
MS	2462,56	5,54				
Gdl	2,00	6,00	8,00			
F	444,87					
$F_{(2,6)}$	5,14					

SS: Devianza, calcolata tra gruppi ed entro gruppi

MS: Varianza, calcolata tra gruppi ed entro gruppi

Gdl: gradi di libertà

F: Statistica di ANOVA

$F_{(2,6)}$: Valore F critico per 2 e 6 gradi di libertà e per $\alpha < 0,05$.

H: Statistica del test di Kruskal-Wallis

H_c : Valore critico tabulato per 2 gradi di libertà e per $\alpha < 0,05$.

Tabella 34. Analisi statistica t-Student eseguita sui valori di 24-h LC_{50} ottenuti nei ceppi di *E. octocarinatus* per la tossicità acuta di Cd^{2+} .

<i>E. octocarinatus</i>	
Test t	1,804
Gdl	4,00
T_c	2,132

Test t: statistica di t-Student

Gdl: gradi di libertà

T_c : valore di t critico per 2 gradi di libertà e per $\alpha < 0,05$.

Dalle osservazioni al microscopio ottico è stato riscontrato che a tutte le concentrazioni testate di Cd, tutti i ceppi e le specie in analisi avevano una locomozione differente rispetto al controllo: i ciliati trattati con Cd si muovevano più lentamente ed esploravano il mezzo cambiando più spesso di direzione rispetto al controllo.

3.4.4. Saggio di bio-accumulo

In Tabella 35 sono mostrati i risultati relativi alla capacità di accumulo dello ione Cd^{2+} da parte delle specie di *Euplotes* analizzate, prendendo in considerazione il ceppo che mostrava il maggiore valore di LC_{50} , così come determinato nella valutazione della tossicità acuta.

Tabella 35. Valori medi di bio-accumulo dello ione metallico Cd^{2+} in *E. aediculatus*.

Specie	Ceppo	Culture	CMI ($\mu\text{g/L}$)	CMF ($\mu\text{g/L}$)	CMR ($\mu\text{g/L}$)	B (%)
<i>E. aediculatus</i>	RoM8	T	90,00	89,92	0,08	
		C-	90,00	90,00	0,00	0,00
		C+	90,00	89,92	0,08	

T. Culture cellulari trattate con una concentrazione di Cu^{2+} pari alla 24-h LC_{50} (con ione metallico e ciliati).

C-. Controllo negativo (senza ione metallico, ma con ciliati).

C+. Controllo positivo (con ione metallico, ma senza ciliati).

CMI. Concentrazione di metallo iniziale.

CMF. Concentrazione di metallo finale (dopo 24 ore di trattamento).

CMR. Concentrazione di metallo rimossa dalle cellule.

B. Percentuale stimata di bio-accumulo dello ione metallico.

Come si può osservare in Tabella 35, la quantità di Cd^{2+} misurata nel pellet cellulare delle colture trattate con lo ione metallico (T) è identica a quella presente nel controllo positivo (C+) (0,08 $\mu\text{g/L}$), indicando che non vi è stato accumulo di ione metallico.

3.5. METALLO PESANTE: TI⁺

3.5.1. Risultati preliminari

Gli esperimenti di tossicità acuta di tallio sono ancora in fase preliminare, i risultati finora ottenuti sono illustrati in Tabella 36.

Tabella 36. Mortalità valutata nei vari ceppi di *Euplotes* analizzati, a diverse concentrazioni di ioni TI⁺.

Specie	Ceppo	Concentrazione TI⁺ testate (µg/L)	Mortalità (numero di individui morti in 10 repliche)
<i>E. aediculatus</i>			
	RoM8	0 (controllo)	0
		0,01	4
		0,1	3
		1	3
<i>E. octocarinatus</i>			
	VTN7	0 (controllo)	0
		0,01	1
		0,1	2
		1	2

3.6. SINTESI DEI RISULTATI OTTENUTI

I risultati di 24-h LC₅₀ calcolati per le specie *E. aediculatus*, *E. harpa* ed *E. octocarinatus* sono riportati in Tabella 36, mentre quelli calcolati per i singoli ceppi sono illustrati in Tabella 37 e 38.

Tabella 37. Valori di LC₅₀ di Cd, Cu e Cr, misurati in diverse specie dulcacquicole di *Euplotes*.

Specie	24-h LC50 (µg/L) ± d.s.			Ordine di tossicità
	Cd	Cu	Cr	
<i>E. aediculatus</i>	56,15 ± 28,65	85,15 ± 11,12	59,36 ± 18,09	Cu > Cr > Cd
<i>E. harpa</i>	57,87 ± 2,18	29,29 ± 0,86	80,98 ± 3,63	Cr > Cd > Cu
<i>E. octocarinatus</i>	71,66 ± 1,90	458,21 ± 352,34	25,09 ± 0,29	Cu > Cd > Cr

Tabella 38. Valori di LC₅₀ di Cd, Cu e Cr, misurati in diversi ceppi di *E. aediculatus*.

Ceppo di <i>E. aediculatus</i>	24-h LC50 (µg/L) ± d.s.			Ordine di tossicità
	Cd	Cu	Cr	
2IP10rK1-2	41,77 ± 2,36	93,00 ± 2,09	64,94 ± 3,73	Cu > Cr > Cd
RoM8	89,14 ± 3,16	85,35 ± 1,19	74,72 ± 3,21	Cd > Cu > Cr
SPZ1	37,53 ± 1,01	71,10 ± 3,90	39,41 ± 0,79	Cu > Cr > Cd

Tabella 39. Valori di LC₅₀ di Cd, Cu e Cr, misurati in diversi ceppi di *E. octocarinatus*.

Ceppo di <i>E. octocarinatus</i>	24-h LC50 (µg/L) ± d.s.			Ordine di tossicità
	Cd	Cu	Cr	
27(11)-III	73,01 ± 2,23	707,36 ± 21,01	24,89 ± 2,10	Cu > Cd > Cr
VTN7	70,32 ± 1,31	209,07 ± 0,72	24,89 ± 2,10	Cu > Cd > Cr

I valori di bio-accumulo calcolati per i tre metalli pesanti in analisi nelle nei tre ceppi e nelle tre diverse specie che hanno dimostrato una migliore resistenza sono illustrati nella seguente tabella (Tab. 39).

Tabella 40. Valori di accumulo di Cd, Cu e Cr, misurati nei ceppi più resistenti di *E. aediculatus*, *E. harpa* ed *E. octocarinatus*.

Ceppo e specie	Metallo testato (µg/L)	Tempo (h)	Accumulo (%)
<i>E. aediculatus</i> Ceppo RoM8	Cd - 90 µg/L	24	0,00
<i>E. octocarinatus</i> Ceppo 27(11)-III	Cu - 700 µg/L	24	1,17
<i>E. harpa</i> Ceppo CIN4	Cr - 80 µg/L	24	0,00

4. DISCUSSIONE

4.1. Accrescimento di protisti ciliati

Le informazioni sulla nutrizione dei protozoi sono importanti per lo studio di questi microrganismi (Holz, 1964). Generalmente, le colture di protozoi si sviluppano in mezzi di coltura costituiti da sali minerali e integrati con composti organici (Holz, 1964; Weekers e Vogels, 1994). Alcuni tipi di alimentazione richiedono supplementi nutrizionali, come vitamine e nucleotidi. Molti protozoi possono passare da una fonte di nutrimento ad un'altra, se le condizioni ambientali cambiano, indice di una loro notevole capacità di adattamento. I ceppi di *Euplotes* possono essere mantenuti in coltura utilizzando sia micro-alghe che batteri, anche se è stato dimostrato che in ceppi marini il primo tipo di cibo ha generalmente un maggiore valore nutrizionale (Dini e Nyberg, 1999). Il contrario è vero per altri ciliati marini come *Euplotidium itoi*, *Leptaspis aspidisca* e *Diophrys oligothrix*, che preferiscono i batteri.

In questo studio, la crescita cellulare dei protozoi dulcacquicoli appartenenti al genere *Euplotes* è stata studiata in un mezzo di coltura ricco di sali (S.M.C.) e utilizzando la micro-alga *Chlorogonium* sp. come fonte di cibo. Solo i sali erano somministrati per la crescita delle micro-alghe, senza aggiunta di alcun supplemento organico. Diversi studi recenti hanno segnalato come diverse specie di protozoi, comprese alcune del genere *Euplotes*, possano stabilire rapporti simbiotici con altri microrganismi (batteri, microsporidi, ecc.) (Vannini et al., 2004; Fokin et al., 2008; Schrallhammer et al., 2011) e nel presente studio la presenza di tali rapporti nelle specie studiate non può essere esclusa.

Tutti i ceppi appartenenti alle tre specie di *Euplotes* analizzate nel presente studio (*E. aediculatus*, *E. octocarinatus*, *E. harpa*) si sviluppavano molto bene nel mezzo di coltura utilizzato, con la micro-alga come fonte di cibo. Ciò è coerente con la possibilità dei ciliati di sintetizzare le loro biomolecole utilizzando gli ioni che costituiscono i sali componenti del terreno di coltura, o utilizzando piccole quantità di molecole organiche rilasciate nel terreno di coltura dalle micro-alghe utilizzate come fonte di cibo (Rehman et al., 2005).

I tre ceppi di *E. aediculatus* analizzati (SPZ1, RoM8 e 2IP10rK1-2), così come i due ceppi di *E. octocarinatus* [VTN7 e 27(11)-III], raggiungevano il massimo valore di concentrazione cellulare (fino ad un valore massimo di 2.500 cellule/mL) in un tempo relativamente breve dall'inoculo della coltura (20 giorni). Al contrario, tempi molto più brevi (di circa la metà) erano necessari al ceppo di *E. harpa* analizzato (CIN4) per raggiungere il massimo valore di concentrazione cellulare (circa 1.250 cellule/mL). Tale differenza nella crescita cellulare riscontrata tra le specie di *Euplotes* analizzate può riflettere molto probabilmente una diversa capacità dei ceppi di utilizzare le risorse energetiche disponibili o una diversa capacità di adattarsi al terreno di coltura subito dopo l'inoculo, richiedendo, nel caso ad esempio di *E. aediculatus* e *E. octocarinatus* una fase di stabilizzazione più lunga.

4.2. Risposte eco-tossicologiche di protisti ciliati a Cu, Cr e Cd

I metalli pesanti arrivano nell'ambiente come inquinanti derivanti da processi di estrazione o di lavorazione dei metalli o da altre industrie. I metalli pesanti possono influenzare la sopravvivenza dei protisti in una varietà di modi. I metalli pesanti possono concentrarsi nelle membrane cellulari e distruggere la loro integrità, causando lisi. La maggior parte dei metalli pesanti ha un rapido effetto sugli enzimi, inattivandoli attraverso il loro legame a gruppi sulfidrilici o aminici delle proteine enzimatiche (Albergoni e Piccinni, 1983). Tra i processi fisiologici ed ecologici dei protisti che possono essere influenzati dai metalli pesanti ce ne sono alcuni - quali la riduzione nell'assorbimento del cibo, l'inibizione della crescita cellulare e la riduzione del tasso di endocitosi - che possono influenzare la sopravvivenza cellulare (Nilsson, 1979; 1981).

Esistono pochi studi sull'interazione tra protozoi ciliati e i metalli pesanti (Coppellotti, 1994; Nilsson, 1996; Gilron e Lynn, 1998; Martín-González *et al.*, 1999; Martín-González *et al.*, 2005), soprattutto rispetto a controlli analoghi realizzati su altri microrganismi quali batteri, funghi unicellulari e micro-alghe (Trevors *et al.*, 1986; Gadd, 1993; Peterson e Nyholm, 1993; Kong *et al.*, 1995; Silver e Phung, 1996; Beveridge *et al.*, 1997; Lovley, 2000; Mane *et al.*, 2011; Moustafa e Idris, 2003). Inoltre, si deve rilevare che è molto difficile stabilire confronti tra gli studi riportati in letteratura sugli effetti tossici dei metalli pesanti nei ciliati, a causa della diversità delle condizioni sperimentali utilizzate (Nilsson, 1989; Gutiérrez *et al.*, 2003). Infatti, è noto che alcuni fattori (pH, composizione del terreno di coltura, ecc.) possono influenzare la quantità bio-disponibile degli ioni metallici (Gadd e Griffiths, 1978; Hickey *et al.*, 1989; Kong *et al.*, 1995; Nederlof e Van Riemsdijk, 1995; Twagilimana *et al.*, 1998) e quindi la potenziale tossicità dei metalli pesanti. Inoltre, i cambiamenti osservati nella valutazione della tossicità dei metalli pesanti dipendono dal parametro utilizzato nei saggi biologici. Così, le dosi letali possono risultare superiori alle concentrazioni in grado di inibire o produrre variazioni nella crescita cellulare o in qualche altro processo fisiologico utilizzato come parametro nei test di citotossicità con i ciliati (Pauli e Berger, 1997). Infine, un altro fattore importante è la concentrazione cellulare utilizzata durante i trattamenti (Twagilimana *et al.*, 1998). Alcuni studi eco-tossicologici eseguiti con protozoi ciliati come organismi modello sono stati effettuati con popolazioni ad elevata concentrazione cellulare (10^3 - 10^5 cellule/mL) (Dessen *et al.*, 2001; Díaz *et al.*, 2001; Bonnet, 2003; Martín-González *et al.*, 2006), mentre altri usano solo poche celle (8 - 24 cellule/saggio biologico) (Vallee e Falchuk, 1993; Madoni *et al.*, 1994; 1996; 2000; 2006). La concentrazione cellulare è importante perché non solo modifica la bio-disponibilità del metallo, ma aumenta anche l'accuratezza dei risultati ottenuti.

Anche se i ciliati non sono microrganismi autotrofi, anch'essi come le micro-alghe (Rai *et al.*, 1981; Peterson e Nyholm, 1993; Brady *et al.*, 1994) presentano, per quanto riguarda i livelli di citotossicità dei tre metalli pesanti testati nel presente studio, due diversi ordini di tossicità, $Cd > Cu > Cr$ oppure $Cu > Cd > Cr$, a seconda delle specie considerate (Nilsson, 1989; Madoni *et al.*, 1992; 1994; Coppellotti, 1994; Janssen *et al.*, 1995; Pauli e Berger, 1997; Gilron e Lynn, 1998; Nicolau *et al.*, 2001; Dias e Lima, 2002). Oltre a queste variazioni inter-specifiche osservate nella tossicità dei metalli pesanti, alcuni dati indicano anche l'esistenza di variazioni intra-specifiche per questa caratteristica (Nilsson, 1989; Xu *et al.*, 1997; Twagilimana *et al.*, 1998; Martín-González *et al.*, 1999).

Come si può osservare dai risultati ottenuti, le specie di protisti ciliati appartenenti al genere *Euplotes* utilizzate nel presente studio (*E. aediculatus*, *E. octocarinatus*, *E. harpa*),

mostrano i seguenti ordini di tossicità dei tre metalli pesanti testati: *E. aediculatus*, Cu > Cr > Cd; *E. octocarinatus*, Cu > Cd > Cr; *E. harpa*, Cr > Cd > Cu. L'ordine di tossicità riscontrato in *E. harpa* (Cr > Cd > Cu) è lo stesso di quello valutato da altri autori in *E. affinis* ed *E. patella* (Madoni *et al.*, 1992; 1994; 2000), mentre un ordine di tossicità esattamente inverso si osserva in *E. aediculatus* rispetto a quello riportato da Madoni e collaboratori (2006) (Cu > Cr > Cd rispetto a Cd > Cr > Cu) (Tabella 40).

Con riferimento ai diversi metalli pesanti testati, le specie di *Euplotes* analizzate mostrano i seguenti ordini di resistenza: Cu, *E. octocarinatus* > *E. aediculatus* > *E. harpa*; Cr, *E. harpa* > *E. aediculatus* > *E. octocarinatus*; Cd, *E. octocarinatus* > *E. harpa* > *E. aediculatus*. *E. octocarinatus* risulta la specie più resistente sia per il rame che per il cadmio, mentre *E. harpa* è quella più resistente per il cromo (Tabella 40).

Per il rame, il valore di 24-h LC₅₀ calcolato nel presente studio in *E. aediculatus* (0,08 mg/L) è il più vicino a quello ottenuto da altri autori in *E. affinis* (0,06 mg/L), mentre il corrispondente valore calcolato nel presente studio in *E. harpa* (0,02 mg/L) è il più vicino a quello ottenuto da altri autori in *E. patella* e *E. aediculatus* (0,01 mg/L). Inoltre, i ceppi di *E. aediculatus* analizzati nel presente studio risultano tutti più resistenti al rame rispetto al ceppo utilizzato da Madoni e collaboratori (2006) (Tabella 40).

Per il cromo, i valori di LC₅₀ calcolati nelle tre specie di *Euplotes* analizzate nel presente studio (0,05, 0,02 e 0,08 mg/L, rispettivamente in *E. aediculatus*, *E. octocarinatus*, *E. harpa*) sono più vicini al corrispondente valore ottenuto da Madoni e collaboratori (2006) in *E. aediculatus* (0,1 mg/L) (Tabella 40).

Per il cadmio, i valori di LC₅₀ calcolati nelle tre specie di *Euplotes* analizzate nel presente studio (0,05, 0,07 e 0,05 mg/L, rispettivamente in *E. aediculatus*, *E. octocarinatus*, *E. harpa*) sono tutti inferiori ai corrispondenti valori ottenuti da altri autori in varie specie di *Euplotes* (Tabella 40).

I cambiamenti nella locomozione riscontrati dalle osservazioni al microscopio ottico potrebbero essere spiegati dagli studi di Mori e collaboratori (2003), i quali hanno analizzato gli effetti del cadmio, del cromo trivalente e del mercurio sul comportamento di *E. crassus*, una specie marina. Da questi studi è stato evidenziato che, a seguito dell'incubazione con questi metalli pesanti, i ciliati cambiano sia la velocità sia la geometria del percorso. Il Cd è l'unico metallo in comune con questo studio, tuttavia è difficile fare un confronto, sia perché *E. crassus* è una specie marina, mentre in quest'analisi sono state studiate solo specie dulcacquicole, sia perché in questo studio non sono state condotte indagini comportamentali.

Tabella 41. Valori di LC₅₀ di Cd, Cu e Cr, misurati a diversi tempi e in diverse specie dulcacquicole di *Euplotes*.

Specie	Metallo testato (mg/L)			Tempo (h)	Ordine di tossicità	Riferimento bibliografico
	Cd	Cu	Cr			
<i>E. affinis</i>	0,40	0,06	2,73	24	Cr > Cd > Cu	Madoni <i>et al.</i> (1992, 1994)
<i>E. patella</i>	2,65	0,01	9,47	24	Cr > Cd > Cu	Madoni <i>et al.</i> (1992, 1994, 2000)
<i>E. aediculatus</i>	0,59	0,01	0,10	24	Cd > Cr > Cu	Madoni <i>et al.</i> (2006)
<i>E. aediculatus</i>	2,76	n.d.	n.d.	24	n.d.	Salvadó <i>et al.</i> (1997)
<i>E. aediculatus</i>	n.d.	48,60	n.d.	192	n.d.	Chaundry <i>et al.</i> (2011)
<i>E. muscicola</i>	n.d.	48,10	n.d.	192	n.d.	Chaundry <i>et al.</i> (2011)
<i>Euplotes</i> sp.	0,70	4,80	n.d.	24	Cu > Cd	Martín-González <i>et al.</i> (2006)
<i>E. aediculatus</i>	0,06	0,09	0,06	24	Cu > Cr > Cd	Presente studio
<i>E. harpa</i>	0,06	0,03	0,08	24	Cr > Cd > Cu	Presente studio
<i>E. octocarinatus</i>	0,07	0,46	0,02	24	Cu > Cd > Cr	Presente studio

n.d.: non determinato.

Oltre a variazioni inter-specifiche osservate nella tossicità acuta dei metalli pesanti nelle tre specie di *Euplotes* analizzate, i risultati ottenuti indicano anche l'esistenza di variazioni intra-specifiche per questa caratteristica. Nelle due specie selezionate per lo studio della variabilità intra-specifica (*E. aediculatus*, *E. harpa*), i vari ceppi analizzati presentavano una diversa resistenza ai metalli pesanti. Per il rame, l'ordine di resistenza dei vari ceppi con-specifici è il seguente: *E. aediculatus*, 2IP10rK1-2 > RoM8 > SPZ1; *E. octocarinatus*, 27(11)-III > VTN7. Per il cromo, l'ordine di resistenza dei vari ceppi con-specifici è il seguente: *E. aediculatus*, 2IP10rK1-2 > RoM8 > SPZ1; *E. octocarinatus*, VTN7 > 27(11)-III. Per il cadmio, l'ordine di resistenza dei vari ceppi con-specifici è il seguente: *E. aediculatus*, RoM8 > 2IP10rK1-2 > SPZ1; *E. octocarinatus*, 27(11)-III > VTN7. In *E. aediculatus*, il ceppo 2IP10rK1-2 risulta quello maggiormente resistente sia per il rame che per il cromo. Questo può essere spiegato considerando l'origine del ceppo, campionato in un cratere vulcanico presso l'Isola di Pasqua. Negli ambienti in cui vi è un'attività vulcanica, si ritrova una maggiore quantità di metalli pesanti; pertanto, è possibile ipotizzare che le specie e le popolazioni di ciliati qui presenti abbiano sviluppato meccanismi di resistenza a tali inquinanti. Il ceppo di *E. aediculatus* che risulta, invece, più resistente al cadmio è RoM8. Anche in questo caso, come si verifica per il ceppo con-specifico 2IP10rK1-2, la maggiore resistenza al metallo pesante può essere spiegata considerando l'origine del ceppo. Il ceppo RoM8 è stato campionato nelle Montagne Rocciose del Colorado. Pur non conoscendo le caratteristiche chimico-fisiche del luogo di origine, tuttavia, anche in questo caso è possibile ipotizzare che il sito di raccolta sia caratterizzato da livelli di Cd tali per cui le popolazioni di ciliati presenti abbiano sviluppato una certa resistenza al metallo.

4.3. Bio-accumulo di Cu, Cr e Cd in protisti ciliati

La resistenza ai metalli pesanti può essere esplicata dai microrganismi in svariate maniere: batteri e micro-alghe sono in grado di produrre biofilm, a cui i metalli possono legarsi, rimanendo intrappolati (Friedman e Dugan, 1968; Phillips *et al.*, 1995); altri microrganismi, sia procariotici che eucariotici, sono in grado di accumulare attivamente i metalli al loro interno, dove possono modificarli tramite metilazione, ossidazione o altre reazioni, riducendone così la tossicità (MacLeod *et al.*, 1967; Lindegren, 1971; Rogers, 1975; Ross, 1975). In alternativa, i microrganismi sono in grado di compartimentalizzare i metalli in appositi vacuoli, che appaiono elettron-densi al microscopio elettronico (Ferstenberg *et al.*, 1975; Martín-González *et al.*, 2006). In *Tetrahymena* sono state identificate delle metallotioneine, proteine in grado di legare i metalli pesanti e coinvolte nella loro detossificazione (Piccinni *et al.*, 1994; Domènech *et al.*, 2008). Alcuni studi hanno valutato il bio-accumulo in protozoi ciliati, misurando le percentuali di metalli pesanti accumulati e dimostrando che questo meccanismo è attivo e che si formano specifici vacuoli elettron-densi, ricchi in metalli (Martín-González *et al.*, 2006; Rehman *et al.*, 2008; 2009).

Rispetto agli studi di tossicità acuta, per i protozoi ciliati si trovano assai meno indagini riguardanti il bio-accumulo di metalli pesanti. Gli studi nel genere *Euplotes* indicano che alcune specie campionate in ambienti inquinati sono potenziali iper-accumulatori di metalli pesanti: *Euplotes* sp. (Martín-González *et al.*, 2006); *E. mutabilis* (Rehman *et al.*, 2008; 2009), *E. aediculatus* ed *E. muscicola* (Chaundry *et al.*, 2011). Gli studi di bio-accumulo condotti sia da Rehman e collaboratori (2008; 2009) che da Chaundry e collaboratori (2011) sono stati effettuati dopo un tempo di incubazione con i metalli di oltre 24 ore, pertanto non è possibile procedere con un confronto con i risultati da loro ottenuti. L'unico studio con cui è possibile confrontarsi è quello di Martín-González e collaboratori (2006), i quali hanno misurato il bio-accumulo di Cd e di Cu a due diverse concentrazioni iniziali (Tabella 41) dopo 24 ore di incubazione, con un protocollo molto simile a quello utilizzato nel presente studio. Martín-González e collaboratori (2006) hanno testato concentrazioni di Cu di 1 mg/L e di 2 mg/L, ottenendo valori di bio-accumulo di 23,6% e 12,6%, rispettivamente. In questo studio sono stati testati 0,8 mg/L di Cu ed il bio-accumulo misurato era del 1,17%. La concentrazione più bassa testata da Martín-González e collaboratori (2006) era maggiore di 14,28 volte per un bio-accumulo maggiore di 10,77 volte. Martín-González e collaboratori hanno riscontrato un bio-accumulo di Cd (90% alla somministrazione di 0,5 mg/L) molto più elevato di quello del Cu. In questo studio non è stato riscontrato bio-accumulo di Cd. *Euplotes* sp. Analizzato da Martín-González e collaboratori (2006) era stato campionato da un impianto a fanghi attivi, pertanto è possibile che si trattasse di una specie adattata a vivere in ambienti inquinati e questo potrebbe spiegare le differenze riscontrate.

Se si prendono in considerazione i risultati ottenuti dai saggi di tossicità acuta, si nota che le specie del presente studio sono molto più sensibili di quella analizzata da Martín-González e collaboratori (2006): *E. octocarinatus* è più sensibile al Cu di *Euplotes* sp. di 10,43 volte e *E. aediculatus* è più sensibile al Cd di 11,67 volte. È pertanto coerente che non vi sia quasi alcun bio-accumulo nelle specie qui in analisi.

Tabella 42. Valori di bio-accumulo di Cd^{2+} , Cr^{6+} e Cu^{2+} nelle specie dulcacquicole di *Euplotes*.

Specie	Metallo somministrato (mg/L)			Accumulo (%)			Tempo (h)	Riferimento
	Cd	Cu	Cr(VI)	Cd	Cu	Cr(VI)		
<i>E. aediculatus</i>	n.d.	46,0 0	n.d.	n.d.	57,0 0	n.d.	192	Chaundry <i>et al.</i> (2011)
<i>E. muscicola</i>	n.d.	46,0 0	n.d.	n.d.	56,0 0	n.d.	192	Chaundry <i>et al.</i> (2011)
<i>Euplotes</i> sp.	0,50 2,00	1,00 2,00	n.d.	90,00 79,40	23,6 12,6 0	n.d.	24	Martín-González <i>et al.</i> (2006)
<i>E. mutabilis</i>	10,0 0	n.d.	10,00	68,00	n.d.	73,00	48	Rehman <i>et al.</i> (2008, 2009)
<i>E. mutabilis</i>	10,0 0	n.d.	10,00	76,00	n.d.	77,00	72	Rehman <i>et al.</i> (2008, 2009)
<i>E. mutabilis</i>	10,0 0	n.d.	10,00	84,00	n.d.	84,00	96	Rehman <i>et al.</i> (2008, 2009)
<i>E. aediculatus</i>	0,09	n.d.	n.d.	0	n.d.	n.d.	24	Presente studio
<i>E. harpa</i>	n.d.	n.d.	0,08	n.d.	n.d.	0	24	Presente studio
<i>E. octocarinatus</i>	n.d.	0,70	n.d.	n.d.	1,17	n.d.	24	Presente studio

n.d.: non determinato.

Le differenze riscontrate con gli altri autori possono essere spiegate considerando tre differenze: hanno somministrato concentrazioni di metalli pesanti sub-letali (inferiori alla LC_{50}), hanno impiegato un maggior volume di cellule (50-100 mL) e hanno atteso tempi maggiori (dalle 48 alle 192 ore). Inoltre, le specie riportate in letteratura provenivano tutte da ambienti inquinati (fanghi attivi e stagni nei pressi di industrie conciarie), mentre quelle di questo studio sono state campionate in fiumi e stagni in cui probabilmente non sussistevano problemi di inquinamento ed i livelli di metalli pesanti presenti era basso. Al momento del campionamento non sono state condotte analisi per una caratterizzazione chimico-fisica delle acque dove i ciliati sono stati raccolti, perciò non ci sono ancora prove a sostegno di questa ipotesi. Andando a vedere i risultati di tossicità acuta si nota che quasi tutte le specie di *Euplotes* analizzate in questo studio sono più sensibili ai metalli pesanti rispetto a quelle riportate in letteratura: è logico supporre che ad una bassa resistenza corrisponda uno scarso sistema di difesa, come può essere il bio-accumulo e la compartimentalizzazione. La sensibilità e la quasi assenza di bio-accumulo sono risultati coerenti tra loro e possono entrambe portare a ipotizzare che gli ambienti di provenienza fossero poco contaminati, oppure che l'adattamento alle condizioni di laboratorio le abbiano portate ad adattarsi e a perdere meccanismi di difesa.

5. CONCLUSIONI

Nel presente studio sono state condotte analisi di tossicità acuta e di bio-accumulo per tre metalli pesanti (Cu, Cr, Cd) in tre specie di protozoi ciliati appartenenti al genere *Euplotes* (*E. aediculatus*, *E. octocarinatus*, *E. harpa*), prendendo in considerazione per ciascuna specie analizzata tre, due e un ceppo, rispettivamente. I risultati ottenuti permettono di trarre alcune conclusioni.

La tossicità acuta del rame (Cu) è risultata diversa nelle tre specie. La specie più tollerante al metallo pesante è *E. octocarinatus*, con un valore medio di 24-h LC₅₀ molto elevato (458,21 µg/L), se confrontato con i corrispondenti valori ottenuti nelle altre due specie analizzate (85,15 µg/L e 29,29 µg/L, rispettivamente in *E. aediculatus* e *E. harpa*). Allo stesso modo, anche la tossicità acuta del cromo (Cr) è risultata caratterizzata da variabilità inter-specifica. La specie più tollerante al metallo è *E. harpa* (con un valore medio di 24-h LC₅₀ pari a 80,98 µg/L), mentre la specie più sensibile è *E. octocarinatus* (con un valore medio di 24-h LC₅₀ pari a 25,09 µg/L). Nel caso del cadmio (Cd), la tossicità acuta è risultata simile in due delle tre specie analizzate (*E. aediculatus* e *E. harpa*, con valori medi di 24-h LC₅₀ pari a 56,15 µg/L e 57,87 µg/L, rispettivamente), mentre la specie più tollerante al metallo era *E. octocarinatus* (con un valore medio di 24-h LC₅₀ pari a 71,66 µg/L).

Oltre a variazioni inter-specifiche osservate nella tossicità acuta dei metalli pesanti nelle tre specie di *Euplotes* analizzate, i risultati ottenuti indicano anche l'esistenza di variazioni intra-specifiche per questa caratteristica. Nelle due specie selezionate per lo studio della variabilità intra-specifica (*E. aediculatus*, *E. octocarinatus*), i vari ceppi analizzati presentano una diversa resistenza ai metalli pesanti.

I tre ceppi della specie *E. aediculatus* sono differenti nella tossicità acuta dei tre metalli pesanti testati, mentre i due ceppi di *E. octocarinatus* hanno mostrato differenze soltanto nella tossicità acuta del rame.

Le tre specie analizzate nel presente studio sono risultate più sensibili al cadmio e al cromo, rispetto ad altre specie dulcacquicole di *Euplotes* analizzate da altri autori. Al contrario, la specie *E. harpa* è risultata più resistente al rame rispetto ad alcune specie dulcacquicole di *Euplotes* analizzate da altri autori (*E. patella*, *E. aediculatus*) (Madoni *et al.*, 1992; 1994; 2006), mentre le specie *E. octocarinatus* e *E. aediculatus* analizzate nel presente studio sono risultate più resistenti allo stesso metallo pesante rispetto alle specie *E. affinis*, *E. patella* e *E. aediculatus*, analizzate da Madoni e collaboratori (1992, 1994, 2006).

Gli esperimenti di bio-accumulo, eseguiti per ciascuna specie analizzata sui ceppi più resistenti ai tre metalli pesanti testati, non hanno dato i risultati attesi sulla base dei dati riportati da altri autori per diverse specie dulcacquicole di *Euplotes*. Infatti, i risultati ottenuti nel presente studio hanno mostrato che, nelle condizioni sperimentali seguite, non vi è alcun bio-accumulo di cadmio e di cromo, mentre una percentuale estremamente bassa (1,17%) di rame è stata accumulata nelle cellule di *E. aediculatus*, dopo la somministrazione del metallo pesante. Molto probabilmente, per osservare valori di bio-accumulo paragonabili a quelli riportati da altri autori in specie di *Euplotes*, è necessario utilizzare colture cellulari a concentrazioni più elevate rispetto a quelle utilizzate nel presente studio.

Considerate la sensibilità delle tre specie di *Euplotes* analizzate nel presente studio ai tre metalli pesanti testati (Cd, Cr e Cu) e la quasi assenza di bio-accumulo nei ceppi più resistenti, le specie *E. aediculatus*, *E. octocarinatus* e *E. harpa* possono essere utilizzate come validi bioindicatori della presenza di metalli pesanti. Inoltre, vista la variabilità intra-specifica riscontrata nella tossicità acuta del rame (da 30 µg/L a 700 µg/L, a seconda dei ceppi), le specie analizzate nel presente studio (in particolare, i singoli ceppi analizzati per

ciascuna di esse) potrebbero essere utili indicatori quantitativi per rilevare diverse concentrazioni di questo metallo in acque sottoposte a diversi livelli di inquinamento.

BIBLIOGRAFIA

Abelson, P. H. e Aldous E.. Ion antagonisms in microorganisms: interference of normal magnesium metabolism by nickel, cobalt, cadmium, zinc, and manganese. *J. Bacteriol.* 60 (1950) 401-413.

Aitio, A., Jarvisalo, J., Kulunen, M., Tossavainen, A., e Vaittinen, P. Urinary excretion of chromium as an indicator of exposure to trivalent chromium sulfate in leather tanning. *Int. Arch. occup. environ. Health*, 54 (1984) 241-249.

Ajmal M., Rao R.A.K., Ahmad R., Ahmad J. Adsorption studies on *Citrus reticulata* (fruit peel of orange) removal and recovery of Ni(II) from electroplating wastewater, *J. Hazard. Mater.* 79 (2000) 117– 131.

Akita S., Castillo L.P., Nii S., Takahashi K., Takeuchi H. Separation of Co(II)/Ni(II) via micelar-enhanced ultrafiltration using organophosphorus acid extractant solubilized by nonionic surfactant, *J. Membr. Sci.* 162 (1999) 111–117.

Albergoni, V., Piccinni, E. Biological response to trace metals and their biochemical effects. In: Leppard, G.G. (Ed.), *Trace Element Speciation in surface Waters and its Ecological Implications*. Plenum Press, New York (1983) pp. 159-174.

Albert, A.: *Selective Toxicity*. Methuen, London (1965)

Aliane A., Bounatiro N., Cherif A.T., Akretche D.E. Removal of chromium from aqueous solution by complexation-ultrafiltration using a water-soluble macroligand, *Water Res.* 35 (9) (2001) 2320– 2326.

Álvarez-Ayuso E., Garcia-Sanchez A., Querol X. Purification of metal electroplating wastewaters using zeolites, *Water Res.* 37 (20) (2003) 4855–4862.

Álvarez-Vazquez H., Jefferson B., Judd S.J. Membrane bioreactors vs. conventional biological treatment of landfill leachate: a brief review, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 79 (2004) 1043– 1049.

Anderson R. A. Chromium as an Essential Nutrient for Humans. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* . Volume 26, Issue 1, August (1997) Pages S35–S4 .

Atkinson B.W., Bux F. e Kasan H.C. “Waste activated sludge remediation of metal-plating effluents”, *Vol. 24* (1998) pp 355-359.

Ayoub G.M., Semerjian L., Acra A., El Fadel M., Koopman B. Heavy metal removal by coagulation with seawater liquid bittern, *J. Environ. Eng.* 127 (3) (2001) 196–202.

Babel S., Kurniawan T.A. Cr(VI) removal from synthetic wastewater using coconut shell charcoal and commercial activated carbon modified with oxidizing agents and/or chitosan, *Chemosphere* 54 (7) (2004) 951–967.

Babich, H., and G. Stotzky: Reductions in the toxicity of cadmium to microorganisms by clay minerals. *Appl. Environ. Microbiol.* 33 (1977) 696-705.

Babich, H., and G. Stotzky: Effect of cadmium on fungi and on interactions between fungi and bacteria in soil: influence of clay minerals and pH. *Appl. Environ. Microbiol.* 33 (1977) 1059-1066.

Bachmann, R. W.: Zinc-65 in studies of the fresh water zinc cycle. *Proceedings of the First National Symposium on Radioecology*, Fort Collins, Colorado, 1961, pp. 485-495. Reinhold, New York (1963).

Bartlett, R.J. and J.M. Kimble. Behavior of Chromium in Soils: II. Hexavalent Forms. *J. Environ. Qual.*, 5(4) (1976) 383-386.

Baruthio François. Toxic effects of chromium and its compounds. *Biological Trace Element Research* 32 (1992) Issue 1-3 , pp 145-153

Beech, I.B., Sunner, J. Biocorrosion: towards understanding interactions between biofilms and metals. *Current Opinion in Biotechnology* 15 (2004) 181-186.

Benfield L.D., Morgan J.M. Chemical precipitation, in: R.D. Letterman (Ed.), *Water Quality and Treatment*, McGraw-Hill Inc., NY (1999) pp. 10.1-10.57.

Benes, P., E. T. Gjessing, and E. Steinnes: Interactions between humus and trace elements in fresh water. *Water Res.* 10 ((1976)) 711-716.

Beveridge T.J., Hughes M.N., Lee H., Leung K.T., Poole R.K., Savvaidis I., Silver S., Gadd J.T. Metal-microbe interactions: Con- temporary approaches, *Adv. Microb. Physiol.* 38 (1997) 177-243.

Bohdziewicz J., Bodzek M., Wasik E. The application of reverse osmosis and nanofiltration to the removal of nitrates from groundwater, *Desalination* 121 (1999) 139-147.

Bonnet J.L., Dussenr M., Bohatier J., Laffosse J. Cytotoxicity assessment of three therapeutics agents, cyclosporin-A, cisplatin and doxorubicin, with the ciliated protozoan *Tetrahymena pyriformis*. *Res Microbiol* 154 (2003) 375-85.

Bose P., Bose M.A., Kumar S. Critical evaluation of treatment strate- gies involving adsorption and chelation for wastewater containing copper, zinc, and cyanide, *Adv. Environ. Res.* 7 (2002) 179-195.

Brady D., Glaum D., Duncan J.R. Copper tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 18 (1994) 245-250.

Brake, S.S., Hasiotis, S.T., Dannelly, H.K., 2004. Diatoms in acid mine drainage and their role in the formation of iron-rich stromatolites. *Geomicrobiology Journal* 21, 331-340.

Bruggen B., Vandecasteele C. Distillation vs. membrane filtration: overview of process evolutions in seawater desalination, *Desalination* 143 (2002) 207-218.

Buckman, H. O., e N. C. Brady. *The Nature and Properties of Soils*. (1969) Macmillan, London.

Charerntanyarak L. Heavy metals removal by chemical coagulation and precipitation, *Water Sci. Technol.* 39 (10/11) (1999) 135–138.

Chaudhry R. and Shakoori A. R. Characterization of copper resistant ciliates: Potential candidates for consortia of organisms used in bioremediation of wastewater. *African Journal of Biotechnology* Vol. 10(45) (2011) pp. 9101-9113.

Chen G.H. Electrochemicals technologies in wastewater treatment, *Sep. Purif. Technol.* 38 (1) (2004) 11–41.

Chen J.P., Chang S.Y., Hung Y.T. Electrolysis, in: L.K. Wang, Y.T. Hung, N.K. Shamas (Eds.), *Physicochemical Treatment Processes*, vol. 3, Humana Press, New Jersey (2004) pp. 359–378.

Cheng R.C., Liang S., Wang H.C., Beuhler M.D. Enhanced coagulation for arsenic removal, *J. AWWA* 86 (9) (1994) 79–90.

Choi H., Zhang K., Dionysiou D.D., Oerther D.B., Sorial G.A. Effect of permeate flux and tangential flow on membrane fouling for wastewater treatment, *Sep. Purif. Technol.* 45 (2005) 68–78.

Cole. M. A.: Lead inhibition of enzyme synthesis in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 33 (1977) 262-268.

Coppellotti O. Effects of cadmium on *Uronema marinum* (Ciliophora, Scuticociliatida) from Antarctica. *Acta Protozool* 33 (1994) 159e67.

Coppellotti, O. Sensitivity to copper in a ciliate as a possible component of biological monitoring in the lagoon of Venice. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 35 (1998) 417-425.

Cox, D. P., and Alexander M. Effect of phosphate and other anions on trimethyl arsine formation by *Candida humicola*. *Appl. Microbiol.* 25 (1973) 408-413.

Curds C.R. The ecology and role of the ciliated protozoa in the activated-sludge process, *Ann. Rev. Microbiol.* 36 (1982) 27–46.

Da Silva G. O. A., Bitencourt J. A. P. , da Silva I. C. , da Costa Pereira D., da Silva N. I. D. e Crapez M. A. C. . Influence of copper on *Euplotes* sp. and associated bacterial population. *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, 42(2) (2014) 381-385.

Dabrowski A., Hubicki Z., Podkos'cielny P., Robens E. Selective removal of the heavy metals from waters and industrial wastewaters by ion-exchange method, *Chemosphere* 56 (2) (2004) 91–106.

Darnall D.W., Greene B., Henzl M.T., Hosea J.M., McPherson R.A., Sneddon J., Alexander M.D. Selective recovery of gold and other metal ions from an algal biomass, *Environ. Sci. Technol.* 20 (1986) 206–208.

Dayan A. D. and Paine A. J. Mechanisms of chromium toxicity, carcinogenicity and allergenicity: Review of the literature from 1985 to 2000. *Hum Exp Toxicol* (2001) 20: 439.

Decreto Legislativo 3 aprile 2006, n. 152. Norme in materia ambientale. *Gazzetta Ufficiale* n. 88 del 14 aprile 2006 - Supplemento Ordinario n. 96.

Dermou E., Velissariou A., Xenos D. and Vayenas D. V. Biological Chromium (VI) Reduction using a trickling filter. *Journal of Hazardous Materials* (2005) pp.78-85.

Dessen, P., Zaguiski, M., Gromadka, R., Plattner, H., Kissmehl, R., Meyer, E., Bétermier, M., Schultz, J. E., Linder, J. U., Pearlman, R. E., Kung, C., Forney, J., Satir, B. H., Van Houten, J. L., Keller, A. M., Froissard, M., Sperling, L. e Cohen, J. *Paramecium* genome survey: A pilot project. *Trend Genet.*, 17 (2001) 306-308.

Dhokpande S.R., Kaware J.P. Biological Methods for Heavy Metal Removal-A Review. *International Journal of Engineering Science and Innovative Technology (IJESIT)* Volume 2, Issue 5, September 2013.

Dias N., Lima N. A comparative study using a fluorescence-based and a directcount assay to determine cytotoxicity in *Tetrahymena pyriformis*. *Res Microbiol* 153 (2002) 313–22.

Díaz S., Benítez L., Alonso S., Martín-González A., Gutierrez J.C. Ciliate metallothioneins: A comparative analysis, in: X Eur. Congress of Biotechnology, Madrid, Spain, 2001.

Dini F. and Nyberg D. Growth rates of marine ciliates on diverse organisms reveal ecological specializations within morphospecies. *Microb. Ecol.*, 37:v (1999) 13–22.

Domènech J., Bofill R., Tinti A., Torreggiani A., Atrian S., Capdevila M. Comparative insight into the Zn(II)-, Cd(II)- and Cu(I)-binding features of the protozoan *Tetrahymena pyriformis* MT1 metallothionein. *Biochimica et Biophysica Acta* 1784 (2008) 693–704.

Duruibe, J. O., Ogwuegbu, M. O. C. e Egwurugwu, J. N. Heavy metal pollution and human biotoxic effects. *International Journal of Physical Sciences*, 2(5) (2007) 112-118.

Edwards M. Chemistry of arsenic removal during coagulation and Fe–Mn oxidation, *J. AWWA* 86 (9) (1994) 64–78.

Ehrlich, H. L.: Microorganisms in acid drainage from a copper mine. *J. Bacteriol.* 86 (1963) 350-352.

Elimelech M., O'Melia C.R. Kinetics of deposition of colloidal particles in porous media, *Environ. Sci. Technol.* 24 (1990) 1528–1536.

Ennis, M. T., and J. C. Brogan: The availability of copper from copper-humic acid complexes. *Ir. J. Agric. Res.* 1 (1961) 35-42.

- Fenchel T. Ecology of Protozoa, Sci. Tech. Publ., Springer-Verlag, Berlin/Madison (1987)
- Ferstenberg, L. B., Stokes P. M., and Silverberg B. An electron microscope study of copper in *Scenedesmus*. International Conference on Heavy Metals in the Environment, Toronto, Ontario, Canada C298-C300 (1975)
- Finlay B.J., Black H.I.J., Brown S., Clark K.J., Esteban G.F., Hinde R.M., Olmo J.L., Rollett A., Vickerman K.. Estimating the growth potential of the soil protozoan community, *Protist* 151 (2000) 69–80.
- Fleming, R. W., and Alexander M. Dimethylselenide and dimethyltellurite formation by a strain of *Penicillium*. *Appl. Microbiol.* 24 (1972) 424-429.
- Fokin S.I., Di Giuseppe G., Erra F. and Dini F. *Euplotespora binucleata* n. gen., n. sp. (Protozoa: Microsporidia), a Parasite Infecting the Hypotrichous Ciliate *Euplotes woodruffi*, with Observations on Microsporidian Infections in Ciliophora. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 55(3) (2008) 214–228.
- Friedman, B. A. and P. R. Dugan: Concentration and accumulation of metallic ions by the bacterium *Zoogloea*. *Dev. Ind. Microbiol.* 9 (1968) 381-388.
- Gadd G. M. and Griffiths A. J. Microorganisms and Heavy Metal Toxicity. *Microbial Ecology* 4 (1978) 303-317.
- Gadd G.M., Interactions of fungi with toxic metals, *New Phytol.* 124 (1993) 25–60.
- Gaetke L. M., Chow C. K. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology* . Volume 189, Issues 1–2, 15 July (2003) Pages 147–163.
- Gilron G.L., Lynn D.H., Ciliated protozoa as test organisms in toxicity assessments, in: P.G. Wells, P.G. Lee, K. Blaise, C. Gauthier (Eds.), *Microscale Testing in Aquatic Toxicology*, CRC Press, Boca Raton, FL (1998) pp. 323–336.
- Gomiero A., Sforzini S., Dagnino A., Nasci C., Viarengo A.. The use of multiple endpoints to assess cellular responses to environmental contaminants in the interstitial marine ciliate *Euplotes crassus*. *Aquatic Toxicology* 114–115 (2012) 206–216.
- Griffiths, A. J., Hughes D. E., e Thomas D. Some aspects of microbial resistance to metal pollution. In M. J. Jones (Ed.): *Minerals and the Environment* (1975) pp. 387-394. Institution of Mining and Metallurgy, Washington, D.C.
- Gutiérrez J.C., Díaz S., Ortega R., Martín-González A. Ciliate resting cyst walls: a comparative review. *Recent Research and Development in Microbiology*, Kerala: Research Signpost (2003) p. 361-79.
- Hamer, D. H. Metallothionein. *Annu. Rev. Biochem.*, 55: (1986) 913-951.

Hassall, K. An asymmetric respiratory response occurring when fluoride and copper ions are applied jointly to *Chlorella vulgaris*. *Physiol. Plantarum* 22 (1967) 304-311.

Hassani A.H, Hossenzadeh, Torabifar, B. "Investigation of Using Fixed Activated Sludge System for Removing Heavy Metals (Cr, Ni and Pb) From Industrial Wastewater", *Journal of Environmental Studies*, Vol. 36 (2010) pp.22-24.

Heckmann K. and Kuhlmann H. W. Mating Types and Mating Inducing Substances in *Euplotes octocarinatus*. *The Journal of Experimental Zoology* 237 (1986) 87-96.

Hickey R.F., Vanderwielen J., Switzenbaum M.S. The effect of heavy metals on methane production and hydrogen and carbon monoxide levels during batch anaerobic sludge digestion, *Water Res.* 23 (1989) 267-273.

Holm, H. W., and M. F. Cox: Transformation of elemental mercury by bacteria. *Appl. Microbiol.* 29 (1975) 491-494.

Holz Jr. G.G. Nutrition and metabolism of ciliates, In: *Biochemistry and physiology of Ptozoa* (ed. HunterSH), Academic Press, New York, 3 (1964) 199-223.

Hughes M. N. and Poole R. K. *Metals and micro-organism*. Chapman and Hall, London (1989) pp. 280-285.

Iftode F., Curgy J., Fleury A., Fryd-Versavel G. Action of a heavy ion Cd²⁺, and the antagonistic effect of Ca²⁺, on two ciliates *Tetrahymena pyriformis* and *Euplotes vannus*, *Acta Protozool.* 24 (1985) 273- 279.

Ilhan S., Nurbas M., Nourbaksh, Kilicarslan S. and Ozdag H. Removal of Chromium, Lead and Copper Ions from Industrial waste Water By *staphylococcus Saprophyticus*", *Turkish Electronics Journal of biotechnology*, Vol 2 (2004) pp.50-57.

INCHEM, International Programme on Chemical Safety. *Environmental Health Criteria*, 61 (1988)

INCHEM, International Programme on Chemical Safety. *Environmental Health Criteria*, 134 (1992)

INCHEM, International Programme on Chemical Safety. *Environmental Health Criteria*, 182 (1996)

INCHEM, International Programme on Chemical Safety. *Environmental Health Criteria*, 200 (1998)

IRSA, Istituto di Ricerca sulle Acque, CNR, <http://www.irsacnr.it/ShPage.php?lang=it&pag=home>

Ito A., Takahashi K., Aizawa J., Umita T. "Enhanced heavy metals removal without phosphorus loss from an aerobically digested sewage sludge", *Water Sci Technol.*, Vol.58 (2008) pp.201-6.

Itoi S., Nakamura I., Kawahara T., Electrodialytic recovery process of metal finishing wastewater, *Desalination* 32 (1980) 383–389.

Janssen M.P.M., Oosterhoff C., Heijmans G.J.S.M., Van der Voet H. The toxicity of metal salts and the population growth of the ciliate *Colpoda cucculus*. *Bull Environ Contam Toxicol* 54 (1995) 597–605.

Janssen L.J.J., Koene L. The role of electrochemistry and electrochemical technology in environmental protection, *Chem. Eng. J.* 85 (2002) 137–146.

Järup L. Hazards of heavy metal contamination *Br Med. Bull.* 68 (1) (2003) 167-182.

Jellinek, H., and S. Sangal: Complexation of metal ions with natural polyelectrolytes (removal and recovery of metal ions from polluted waters). *Water Res.* 6 (1972) 305-314.

Ji G. and Silver S. Bacterial resistance mechanism for heavy metals of environmental concern. *J. indust. Microbiol.*, 14 (1995) 61-75.

Johnson D. B. e Hallberg K. B. The microbiology of acidic mine waters. *Research in Microbiology* 154 (2003) 466-473.

Juang R.S., Shiau R.C. Metal removal from aqueous solutions using chitosan-enhanced membrane filtration, *J. Membr. Sci.* 165 (2000)159–167.

Jüttner K., Galla U., Schmieder H. Electrochemical approaches to environmental problems in the process industry, *Electrochim. Acta* 45 (2000) 2575–2594.

Kaegi, J. H. R. Overview of metallothionein. *Methods Enzymol.*, 205 (1991) 613-626.

Kim, S.-H., Jung M.-Y. e Lee Y.-M.. Effect of heavy metals on the antioxidant enzymes in the marine ciliate *Euplotes crassus*. *Toxicol. Environ. Health Sci.*, 3(4) (2011) 213-219.

Kirpnick-Sobol Z., Reliene R., e Schiestl R. H. Carcinogenic Cr(VI) and the Nutritional Supplement Cr(III) Induce DNA Deletions in Yeast and Mice. *Cancer Res* April 1 (2006) 66; 3480.

Klassen, C. D., Liu, J. and Choudhuri, S. Metallothionein: An intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 39 (1999) 267-294.

Koby M. Removal of Cr(VI) from aqueous solutions by adsorption onto hazelnut shell activated carbon: kinetic and equilibrium studies, *Biores. Technol.* 91 (2004) 317–321.

Kong I.C., Bitton G., Koopman B., Jung K.H. Heavy metal toxicity testing in environmental samples. *Rev Environ Contam Toxicol*, 142 (1995) pp. 119–147.

Kongsricharoern N., Polprasert C. Electrochemical precipitation of chromium (Cr⁶⁺) from an electroplating wastewater, *Water Sci. Technol.* 31 (9) (1995) 109–117.

Korngold E., Belayev N., Aronov L. Removal of chromates from drinking water by anion

exchangers, Sep. Purif. Technol. 33 (2) (2003) 179–187.

Kryvoruchko A., Yurlova L., Kornilovich B. Purification of water containing heavy metal by chelating-enhanced ultrafiltration, Desalination 144 (2002) 243–248.

Kurniawan T.A., Babel S. A research study on Cr(VI) removal from contaminated wastewater using low-cost adsorbents and commercial activated carbon, in: Proceedings of the 2nd International Conference on Energy Technology Towards a Clean Environment (RCETE), vol. 2, Phuket, Thailand, 12–14 February, 2003, pp. 1110–1117.

Kurniawan T.A., Gilbert Y.S. Chan, Lo W.H., Babel S. Physico-chemical treatment techniques for wastewater laden with heavy metals. Chemical Engineering Journal 118 (2006) 83–98.

Kusch, J. e Heckmann, K. Gamone Production in Large-Scale Cultures of Euplotes octocarinatus. J. Protozol., 35(3) (1988) 337–340.

Laborey F. and Lavollay J. Sur l'antitoxicite du calcium et du magnesium a l'egard du cadmium, dans la croissance d' Aspergillus niger. C.R. Acad. Sci. [D] (Paris) 284 (1997) 639–642.

Laine J.M., Vial D., Moulart P. Status after 10 years of operation—overview of UF technology today, Desalination 131 (2000) 17–25.

Lainé S., Poujol T., Dufay S., Baron J., Robert P. Treatment of stormwater to bathing water quality by dissolved air flotation, filtration and ultraviolet disinfection, Water Sci. Technol. 38 (10) (1998) 99–105.

Leyva-Ramos R., Rangel-Mendez J.R., Mendoza-Barron J., Fuentes- Rubio L., Guerrero-Coronado R.M. Adsorption of cadmium(II) from aqueous solution onto activated carbon, Water Sci. Technol. 35 (7) (1997) 205–211.

Li Y.J., Zeng X.P., Liu Y.F., Yan S.S., Hu Z.H., Ya-Ming. Study on the treatment of copper-electroplating wastewater by chemical trapping and flocculation, Sep. Purif. Technol. 31 (2003) 91–95.

Lindgren, C. C.: The mitochondria in intoxication and detoxication. Physiol. Chem. Phys. 3 (1971) 499–500.

Lovley DR. Environmental microbe-metal interactions. Washington (DC): ASM Press; 2000.

Madoni P., Esteban G., Gorbi G. Acute toxicity of cadmium, copper, mercury, and zinc to ciliates from activated sludge plants. Bull Environ Contam Toxicol 49 (1992) 900–905.

Madoni P., Davoli D., Gorbi G. Acute toxicity of lead, chromium and other heavy metals to ciliates from activated sludge plants, Bull. Environ. Contam. Toxicol. 53 (1994) 420–425.

Madoni P. Manuale di applicazione: la microfauna nell'analisi di qualità biologica dei fanghi attivi. Azienda Gas Acqua Consorziale di Reggio Emilia e Università degli Studi di Parma

(1994).

Madoni P., Davoli D., Gorbi G., Vescovi L. Toxic effect of heavy metals on the activated sludge protozoan community, *Water Res.* 30 (1996) 135–141.

Madoni P. The acute toxicity of nickel to freshwater ciliates. *Environmental Pollution* 109 (2000) 53-59.

Madoni P. e Romeo M. G. Acute toxicity of heavy metals towards freshwater ciliated protists. *Environmental Pollution* 141 (2006) 1-7

MacLeod, R. A., S. C. Kuo, and R. Gelinas: Metabolic injury to bacteria. II. Metabolic injury induced by distilled water or copper in the plating diluent. *J. Bacteriol.* 93 (1967) 961-969.

Mane P. C., Bhosle A. B., Jangam C. M and Vishwakarma C. V. "Bioadsorption of Selenium by Pretreated Algal Biomass", *Advances in applied science research*, Vol. 2 (2011) pp-207-211.

Marchei E., Pellegrini M., Pacifici R., Zuccaio P., Pichini S. Composizione chimica del fumo principale di sigaretta. Istituto Superiore di Sanità, Dipartimento del Farmaco (2003)

Marshall W.E., Wartelle L.H., Boler D.E., Johns M.M., Toles C.A. Enhanced metal adsorption by soybean hulls modified with nitric acid, *Biores. Technol.* 69 (1999) 263–268.

Martín-González A., Díaz S., Jareño C., Gutiérrez J.C. The use of protists in ecotoxicology: applications and perspectives. *Recent Res Dev Microbiol*, 3 (1999) pp. 93–111.

Martín-González A., Díaz S., Borniquel S., Gallego A., Gutiérrez J. C. Cytotoxicity and bioaccumulation of heavy metals by ciliated protozoa isolated from urban wastewater treatment plants. *Research in Microbiology* 157 (2006) 108–118.

Martínez S.A., Rodríguez M.G., Aguilar R., Soto G. Removal of chromium hexavalent from rinsing chromating waters electrochemicals reduction in a laboratory pilot plant, *Water Sci. Technol.* 49 (1) (2004) 115–122.

Matis K.A., Zouboulis A.I., Lazaridis N.K., Hancock I.C. Sorptive flotation for metal ions recovery, *Int. J. Miner. Process* 70 (2003) 99–108.

Matis K.A., Zouboulis A.I., Gallios G.P., Erwe T., Blocher C. Application of flotation for the separation of metal-loaded zeolite, *Chemosphere* 55 (2004) 65–72.

McDermott, G. N., W. A. Moore, M. A. Post, and M. B. Ettinger: Effects of copper on aerobic biological sewage treatment. *J. Water Pollut. Control Fed.* 35 (1963) 227-241.

Miyake, A. e Beyer, J. Cell interaction by means of soluble factors (gamones) in conjugation of *Blepharisma* intermedium. *Exp. Cell Res.*, 76 (1973) 15-24.

Mohammad A.W., Othaman R., Hilal N. Potential use of nanofiltration membranes in treatment of industrial wastewater from Ni-P electroless plating, *Desalination* 168 (2004)

241–252.

Molwantwa J.B., Molipane N.P. and Rose P.D. Biological sulphate reduction utilizing algal extracellular products as a carbon source. Presented at the WISA 2000 Biennial Conference, Sun City, South Africa, 28 May to 1 June 2000.

Monser L., Adhoum N. Modified activated carbon for the removal of copper, zinc, chromium, and cyanide from wastewater, Sep. Purif. Technol. 26 (2002) 137–146. R. Leyva-Ramos, L.A.B.

Mori G., Erra F., Cionini K. e Banchetti R. Sublethal doses of heavy metals and Slow-Down pattern of *Euplotes crassus* (Ciliophora, Hypotrichia): A behavioural bioassay. Italian Journal of Zoology, 70:1 (2003) 23-30.

Moustafa M. and Idris G. “Biological removal of heavy metals from wastewater” Alexandria Engineering Journal, Vol. 42 (2003) pp.767-771.

Nederlof M.N., Van Riemsdijk W.H. Effect of natural organic matter and pH on the bioavailability of metals ions in soils, in: P.G. Huang (Ed.), Environmental Impact of Soil Component Interactions, vol. II, Metals, Other Inorganics, and Microbial Activities, CRC–Lewis, Boca Raton, FL (1995) pp. 75–86.

Negishi T., Oshima K., Hattori M., Kanai M., Mano S. Tonoplast and Plasma Membrane Localized Aquaporin-Family Transporters in Blue Hydrangea Sepals of Aluminum Hyperaccumulating Plant. PLoS ONE 7(8) (2012) e43189.

Nicolau A., Dias N., Mota M., Lima N. Trends in the use of protozoa in the assessment of wastewater, Res. Microbiol. 152 (2001) 621–630.

Niederlehner B.R., Pratt J.R., Buikema A.L., Cairns Jr J. Laboratory tests evaluating effects of cadmium on freshwater communities, Environ. Toxicol. Chem. 4 (1985) 155–165.

Nilsson, J.R.. Phagotrophy in *Tetrahymena*. In: Levandowsky, M., Hutner, S.H. (Eds.), Biochemistry and Physiology of Protozoa. Academic Press, New York (1979) pp. 339-379.

Nilsson, J.R. Effect of copper on phagocytosis in *Tetrahymena*. Protoplasma 109 (1981) 359-370.

Nilsson J.R. *Tetrahymena* in cytotoxicology: with special reference to effects of heavy metals and selected drugs. Eur J Protistol 25 (1989) 2-25.

Nilsson J.R. Effects of a bismuth salt on cell proliferation, endocytosis and fine structure of *Tetrahymena*. Eur J. Protistol 32 (1996) 283-92.

Ning R.Y. Arsenic removal by reverse osmosis, Desalination 143 (2002) 237–241.

Offringa G., Dissolved air flotation in Southern Africa, Water Sci. Technol. 31 (3/4) (1995) 159–172.

Ouki S.K., Neufeld R.D., Perry R. Use of activated carbon for the recovery of chromium from industrial wastewaters, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 70 (1997) 3–8.

Oura, E., and H. Suomalainen: Yeast nutrition and solute uptake. In A. H. Rose and J. S. Harrison (Eds.): *The Yeasts, Vol. 2* (1971) pp. 3-74. Academic Press, London.

Palmer C. D. e Puls R. W. Natural Attenuation of Hexavalent Chromium in Groun Water and Soils. EPA Environmental Assessment Sourcebook, by J. Russell Boulding (1996)

Paton, W. H. N., and Budd K. Zinc uptake in *Neocosmospora vasinfecta*. *J. Gen. Microbiol.* 72 (1972) 173-184.

Pauli W., Berger S. Toxicological comparisons of *Tetrahymena* species, end poinds and growth media: Supplementary investigations of the pilot ring test, *Chemosphere* 35 (1997) 1043–1052.

Persin F., Rumeau M. Le traitement électrochimique des eaux et des effluents, *Tribune de l'eau* 3 (42) (1989) 45–46.

Peter A.L.J., Viraraghavan T. Thallium: a review of public health and environmental concerns. *Environment International* 31 (2005) 493– 501.

Peterson H.G., Nyholm N. Algal bioassays of metal toxicity identification, *Water Poll. Res. J. Can.* 28 (1993) 129–153.

Phillips, P., Bender, J., Simms, R., Rodriguez-Eaton, S., Britt, C. Manganese removal from acid coal-mine drainage by a pond containing green algae and microbial mat. *Water Science and Technology* 31 (1995) 161–170.

Piccinni E., Irato P., Guidolin L. Cadmium-thionein in *Tetrahymena thermophila* and *Tetrahymena pyriformis*, *Eur. J. Protistol.* 26 (1990) 176–181.

Piccinni E., Staudenmann W., Albergoni V., De Gabrieli R., James P. Purification and primary structure of metallothioneins induced by cadmium in the protists *Tetrahymena pigmentosa* and *Tetrahymena pyri-formis*, *Eur. J. Biochem.* 226 (1994) 853–859.

Piccinni E., Albergoni V., Cadmium detoxification in protists, *Comp. Biochem. Physiol.* 113 (1996) 141–147.

Pickett, A. W., and A. C. R. Dean: Cadmium and zinc sensitivity and tolerance in *Klebsiella (Aerobacte19 aerogenes)*. *Microbiology IS* (1976) 79-91.

Polprasert C., Charnpratheeep K. “Heavy metal removal by attached growth waste stabilization pond”, Vol.23 (1989) pp.625-631.

Polak L. Immunology of chromium. In Burrows D (Ed). *Chromium: Metabolism and Toxicology*. CRC Press, Boca Raton, FL, 1983, pp. 51 – 123.

- Poole R. K. and Gadd G. M. Metals: microbe interactions. IRL Press, Oxford (1989) pp. 1-37.
- Qdais H.A., Moussa H. Removal of heavy metals from wastewater by membrane processes: a comparative study, *Desalination* 164 (2004) 105–110.
- Rai L.C., Gaur J.P., Kumar H.D. Phycology and heavy-metal pollution, *Biol. Rev.* 56 (1981) 99–151.
- Reed, R.H., Gadd, G.M. Metal tolerance in eukaryotic and prokaryotic algae. In: Shaw, A.J. (Ed.), *Heavy Metal Tolerance in Plants*. CRC Press (1989)
- Rehman A., Ashraf S., Qazi J.I., Shakoori A.R. Uptake of lead by a ciliate, *Stylonychia mytilus*, isolated from industrial effluents: potential use in bioremediation of wastewater. *Bull. Environ. Contamin. Toxicol.*, 75 (2005) 290-296.
- Rehman A., Shakoori F.R., Shakoori A.R. Heavy metal resistant freshwater ciliate, *Euplotes mutabilis*, isolated from industrial effluents has potential to decontaminate wastewater of toxic metals. *Bioresour Technol* 99 (2008) 3890–3895.
- Rehman A., Shakoori F.R., Shakoori A.R. Heavy Metal Uptake by *Euplotes mutabilis* and its Possible Use in Bioremediation of Industrial Wastewater. *Bull Environ Contam Toxicol* (2009).
- Rengaraj S., Yeon K.H., Moon S.H. Removal of chromium from water and wastewater by ion exchange resins, *J. Hazard. Mater.* B87 (2001) 273–287.
- Rogers, R. D. Methylation of mercury in the terrestrial environment. International Conference on Heavy Metals in the Environment, Toronto, Ontario, Canada C218-C219 (1975)
- Rolhstein, A., and A. D. Hayes: The relationship of the cell surface to metabolism. XII1. The cation binding properties of the yeast cell surface. *Arch. Biochem. Biophys.* 63 (1956) 87-99.
- Rose P.D., Boshoff G.A., Van Hille R.P., Wallace L.M.C., Dunn K.M. and Duncan J.R. An integrated algal sulphate reducing high rate ponding process for the treatment of acid mine drainage wastewaters. *Biodegradation* 9 (1998) 247–257.
- Rose P. Review. Long-term sustainability in the management of acid mine drainage wastewaters – development of the Rodhes BioSURE Process. *Water SA* Vol. 39 No. 5 October 2013.
- Ross, I.S.: Some effects of heavy metals on fungal cells. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 64 (1975) 175-193 .
- Rossin A.C., Sterritt R. M., Lester J. N. The influence of process parameters on the removal of heavy metals in activated sludge, *Pollution* February 1982, Volume 17, Issue 2, pp 185-

198.

Rubio J., Tessele F. Removal of heavy metal ions by adsorptive particulate flotation, Min. Eng. 10 (7) (1997) 671–679.

Sablani S.S., Goosen M.F.A., Al-Belushi R., Wilf M. Concentration polarization in ultrafiltration and reverse osmosis: a critical review, Desalination 141 (2001) 269–289.

Saffaj N., Loukil H., Younssi S.A., Albizane A., Bouhria M., Persin, Larbot A. Filtration of solution containing heavy metals and dyes by means of ultrafiltration membranes deposited on support made of Moroccan clay, Desalination 168 (2004) 301–306.

Salvadó H., Gracia M. P., Amigó J. M., Rius M., 1997. Effects of Cadmium on Growth and Motility in *Euplotes aediculatus* Isolated from Activated Sludge. Bull. Environ, Contam. Toxicol. 58 (1997) 838-844.

Semerjian L., Ayoub G.M. High-pH-magnesium coagulation–flocculation in wastewater treatment, Adv. Environ. Res. 7 (2003) 389– 403.

Sapari N., Idris A., Hisham N. Total removal of heavy metal from mixed plating rinse wastewater, Desalination 106 (1996) 419–422.

Schrallhammer M., Schweikert M., Vallesi A., Verni F., Petroni FG.. Detection of a Novel Subspecies of *Francisella noatunensis* as Endosymbiont of the Ciliate *Euplotes raikovi*. Microbial Ecology. 2011, Volume 61, Issue 2 (2011) pp 455-464.

Shammas N.K. Coagulation and flocculation, in: L.K. Wang, Y.T. Hung, N.K. Shammas (Eds.), Physicochemical Treatment Processes, vol. 3, Humana Press, New Jersey (2004) pp. 103–140.

Shim J.W., Lee S.M., Rhee B.S., Ryu S.K. Adsorption of Ni(II), Cu(II), Cr(VI) from multi-component aqueous solution by pitch-based ACF, in: Proceeding of the European Carbon Conference “Carbon 96”, New Castle, UK, 1996.

Silver S., Phung L.T. Bacterial heavy metal resistance: New surprises, Ann. Rev. Microbiol. 50 (1996) 753–789.

Slater C.S., Ahlert R.C., Uchirin C.G. Applications of reverse osmosis to complex industrial wastewater treatment, Desalination 48 (1983) 171–187.

Srivastava N.K., Majumder C.B. “Novel bio filtration methods for the treatment of heavy metals from industrial wastewater”, J Hazard Mater. Vol.151 (2008) pp.1-8.

Stemann Nielsen E., and Kamp-Nielsen L. Influence of deleterious concentrations of copper on the growth of *Chlorella pyretoidosa*. Physiol. Plantarum 22 (1970) 1121-1133.

Stevenson, F. J.: Binding of metal ions by humic acids. In J. O. Nriagu (Ed.): Environmental Biogeochemistry, Vol. 2. (1976) pp. 519-540. Ann Arbor Science, Ann Arbor, Mich.

Subbaiah T., Mallick S.C., Mishra K.G., Sanjay K., Das R.P. Electrochemical precipitation of nickel hydroxide, J. Power Sources 112 (2002) 562–569.

Trevors J.T., Stratton G.W., Gadd G.M. Cadmium transport, resistance and toxicity in bacteria, algae and fungi, Can. J. Microbiol. 32 (1986) 447–464.

Tunay O. Developments in the application of chemical technologies to wastewater treatment, Water Sci. Technol. 48 (11/12) (2003) 43–52.

Twagilimana L., Bohatier J., Groliere C.A., Bonnemoy F., Sargos D. A new low-cost microbiotest with the protozoan *Spirostomum* teres: Culture conditions and assessment of sensitivity of the ciliate to 14 pure chemicals, Ecotoxicol. Environ. Saf. 57 (1998) 231–244.

Twining B.S., Twiss M.R., Fisher N.S. Oxidation of Thallium by Freshwater Plankton Communities. Environ. Sci. Technol. 37 (2003) 2720–2726.

Twining B.S., Baines S.B., Fisher N.S., Maser J., Vogt S., Jacobsen C., Tovar-Sanchez A. and Sañudo-Wilhelmy S.A. Quantifying Trace Elements in Individual Aquatic Protist Cells with a Synchrotron X-ray Fluorescence Microprobe. Anal. Chem. 75 (2003) 3806–3816.

Twining B.S. e Fisher N.S. Trophic transfer of trace metals from protozoa to mesozooplankton. Limnol. Oceanogr., 49(1) (2004) 28–39.

Twiss M.R., Twining B.S. e Fisher N.S. Bioconcentration of inorganic and organic thallium by freshwater phytoplankton. Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 23, No. 4 (2004) pp. 968–973.

Tyagi R.D., Couillard D., Tran F., “Heavy metals removal from an aerobically digested sludge by chemical and microbiological methods”, Environ Pollut. 50(4) (1988) 295–316.

Uauy R., Olivares M., and Gonzalez M. Essentiality of copper in humans . Am J Clin Nutr 67(suppl) (1998) 952S–9S.

Ujang Z., Anderson G.K. Application of low-pressure reverse osmosis membrane for Zn²⁺ and Cu²⁺ removal from wastewater, Water Sci. Technol. 34 (9) (1996) 247–253.

US Environmental Protection Agency (EPA), Development Document for Effluent Limitations Guidelines and Standards for the Metal Finishing Point Source Category, US EPA, Washington, DC, 1980 (EPA- 440/1-80/091-a).

US Environmental Protection Agency (EPA), Control and treatment technology for the metal finishing industry, sulfide precipitation, Summary Report, US EPA, Washington, DC, (EPA-625/8-80/003), 1980.

US Environmental Protection Agency (EPA), Chemical Precipitation, US EPA, Washington, DC, 2000 (EPA832-F-00-018).

Vallee B.L., Falchuk H. The biochemical basis of zinc physiology, Physiol. Rev. 73 (1993) 79–118.

Vannini, C., Rosati, G., Verni, F. e Petroni, G. Identification of the bacterial endosymbionts of the marine ciliate *Euplotes magnicirratu*s (Ciliophora, Hypotrichia) and proposal of '*Candidatus Devosia euplotis*'. *Int J Syst Evol Microbiol* 54 (2004) 1151–1156.

Viarengo, A., Accomando, R., Ferrando, I., Beltrame, F., Fato, M., Marcenaro, G. Heavy metal effects on cytosolic free Ca²⁺ level in the marine protozoan *Euplotes crassus* evaluated by confocal laser scanning microscopy. *Comp. Biochem. Physiol.* 113C (1996) 161–168.

Viera, R. H. S. F. and Volesky, B. Biosorption: A solution to pollution? *Int. Microbiol.*, 3 (2000) 17-24.

Vincent J. B.. Chromium: Is It Essential, Pharmacologically Relevant, or Toxic? Interrelations between Essential Metal Ions and Human Diseases. *Metal Ions in Life Sciences* Volume 13 (2013) pp 171-198.

Vigneswaran S., Ngo H.H., Chaudhary D.S., Hung Y.T. Physicochemical treatment processes for water reuse, in: L.K. Wang, Y.T. Hung, N.K. Shamas (Eds.), *Physicochemical Treatment Processes*, vol. 3, Humana Press, New Jersey (2004) pp. 635–676.

Vik E.I., Carlsson D.A., Eikum A.S., Gjessing E.T. Electrocoagulation of potable water, *Water Res.* 18 (1984) 1355–1360.

Vonk, J. W., and A. K. Sijpesteijn: Studies on the methylation of mercuric chloride by pure cultures of bacteria and fungi. *Antonie van Leeuwenhoek* 39 (1973) 505-513.

Walker, J. D., and R. R. Colwell: Mercury-resistant bacteria and petroleum degradation. *Appl. Microbiol.* 27 (1974) 285-287.

Wallwork-Barber M.K., Lyall K., Ferenbaugh R.W. Thallium movement in an aquatic ecosystem. *J Environ Sci Health.* A20(6) (1985) 689–700.

Wang L.K., Vaccari D.A., Li Y., Shamas N.K. Chemical precipitation, in: L.K. Wang, Y.T. Hung, N.K. Shamas (Eds.), *Physicochemical Treatment Processes*, vol. 3, Humana Press, New Jersey (2004) pp. 141–198.

Wang J., Chen C. "Biosorbents for heavy metals removal and their future", *Biotechnology Advances* Vol.27 (2009) pp195–226.

Weekers P.H.H., Vogels G.D. Axenic cultivation of the free living soil amoeba, *Acanthamoeba castellanii* and *Harmanella vermiformis* in a chemostat. *J. Microbiol. Method*, 19 (1994) 13-18.

Whitton, B. A., and P. J. Say: Heavy metals. In B. A. Whitton (Ed.): *River Ecology*, pp. 286-312. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1975).

Hai Suo W., Ai-Qiang Z., Lian-sheng W. "Immobilization study of biosorption of heavy metal ions on to activated sludge," *Journal of Environmental Science*, vol. 16 (2004) pp. 640-645.

Xu Z., Bowers N., Pratt J.R. Variation in morphology, ecology and toxicological responses of *Colpoda inflata* (Stokes) collected from five biogeographic realms, Eur. J. Protistol. 33 (1997) 136–144.

Yamagushi N., Wada O., Ono T., Yazaki K., Toyokama K. Detection of heavy metal toxicity by *Tetrahymena pyriformis* culture method, Ind. Health 11 (1973) 27–31.

Yamagushi N., Wada O., Ono T., Yazaki K., Higuchi K., Antagonistic effect of cadmium on acute toxicity of cadmium to *Tetrahymena pyriformis*, Ind. Health. 12 (1974) 85–87.

Yang X.J., Fane A.G., MacNaughton S. Removal and recovery of heavy metals from wastewater by supported liquid membranes, Water Sci. Technol. 43 (2) (2001) 341–348.

Yurlova L., Kryvoruchko A., Kornilovich B. Removal of Ni(II) ions from wastewater by micellar-enhanced ultrafiltration, Desalination 144 (2002) 255–260.

Zabel T. Flotation in water treatment, in: K.J. Ives (Ed.), The Scientific Basis of Flotation, Martinus Nijhoff Publishers, The Hague, 1984, pp. 349–378.

Zajic, J. E.: Microbiol Biogeochemistry. Academic Press, New York (1969)

Zamboulis D., Pataroudi S.I., Zouboulis A.I., Matis K.A. The application of sorptive flotation for the removal of metal ions, Desalination 162 (2004) 159–168.

Zimmerman, L.: Toxicity of copper and ascorbic acid to *Serratia marcescens*. J. Bacteriol. (1966) 1537-1542.

Zitko V. Toxicity and pollution potential of thallium. Sci Total Environ. 4 (1975) 185– 92.

RINGRAZIAMENTI

I più sentiti ringraziamenti vanno al prof. Di Giuseppe, il cui supporto per lo svolgimento del presente lavoro è stato fondamentale; al dott. Frontini, per tutti i suoi insegnamenti in materia di colture di protisti; al dott. Erra per l'aiuto nell'elaborazione dei dati e nell'analisi statistica.

Si ringrazia anche l'Unità di Zoologia-Antropologia, in particolare il dott. Bartoli per il suo contributo e la sua disponibilità.

Ringraziamenti sentiti vanno anche al prof. D'Orazio e al prof. Petrini del Dipartimento di Scienze della Terra, i quali hanno gentilmente messo a disposizione il proprio tempo e hanno svolto le analisi allo spettrometro ICP-MS.

Gli ultimi ma non meno importanti ringraziamenti spettano alla famiglia e agli amici per tutto il loro supporto.